

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

昭63-501876

⑬ 公表 昭和63年(1988)7月28日

⑭ Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	審査請求有	予備審査請求	未請求	部門(区分)	3(2)
A 61 K 49/02 47/00	3 3 0 3 4 8	A-6742-4C B-6742-4C B-6742-4C					(全 29 頁)

⑯ 発明の名称 スターバーストコンジュゲート

⑰ 特 願 昭62-505281
⑱ 出 願 昭62(1987)8月18日

⑲ 翻訳文提出日 昭63(1988)4月18日
⑳ 国際出願 PCT/US87/02074
㉑ 国際公開番号 WO88/01178
㉒ 国際公開日 昭63(1988)2月25日

優先権主張 ㉓ 1986年8月18日 ㉔ 米国(US) ㉕ 897,455

⑳ 発 明 者	トマリア, ドナルド・エイ	アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・ウェストチツペワリ バーロード463
㉑ 発 明 者	カプラン, ドナルド・エイ	アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・イーストパークドラ イブ919
㉒ 発 明 者	クルバー, ウィリアム・ジェイ	アメリカ合衆国ミシガン州48657サンフォード・バーデンロード230
㉓ 出 願 人	ザ・ダウ・ケミカル・カンパニ ー	アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・アボットロード・グ ウセンター2030
㉔ 代 理 人	弁理士 小田島 平吉	
㉕ 指 定 国	BR, DK, HU, JP, KR, NO	

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. 少なくとも1単位の少なくとも1種の担持された製薬学的物質とアソシエーションして少なくとも1種のスターバーストポリマーを含むでなるスターバーストコンジュゲート。
2. 前記スターバーストポリマーはスターバーストデンドリマーである請求の範囲第1項記載のコンジュゲート。
3. 前記少なくとも1種の担持された製薬学的物質は、薬物、放射性核種、キレート剤、キレート化金属、トキシン、抗体、抗体断片、抗原、シグナル発生因子、シグナル反射因子、またはシグナル阻害因子である請求の範囲第1または2項記載のコンジュゲート。
4. 少なくとも2種の異なる担持された物質が存在し、それらの少なくとも1種は標的ディレクターであり、そしてそれらの少なくとも1種は生物活性因子である請求の範囲第2項記載のコンジュゲート。
5. 前記標的ディレクターは1種または2種以上の標的レセプターに対して特異的である実在因子であり、そして前記生物活性因子は放射性核種、薬物、またはトキシンである請求の範囲第4項記載のコンジュゲート。
6. 前記標的ディレクターはポリクローナル抗体またはその断片である請求の範囲第4または5項記載のコンジュゲート。
7. 前記標的ディレクターはモノクローナル抗体またはその断片である請求の範囲第4または5項記載のコンジュゲート。
8. 前記デンドリマーは不連続性を含有する請求の範囲第1項記載のコンジュゲート。
9. 式:

$$(P) \times x (M) y \quad (1)$$

- 式中、各Pはデンドリマーを表わし、
xは1またはそれより大きい整数を表わし、
各Mは担持された製薬学的物質の単位を表わし、前記担持された製薬学的物質は同一の担持された製薬学的物質または異なる担持された製薬学的物質であることができ、
yは1またはそれより大きい整数を表わし、そして
*は前記担持された製薬学的物質が前記デンドリマーとアソシエーションしていることを示す、
の請求の範囲第1項記載のスターバーストコンジュゲート。
10. Mは、薬物、有害生物防除剤、放射性核種、キレート剤、キレート化金属、トキシン、抗体、抗体断片、抗原、シグナル発生因子、シグナル反射因子、またはシグナル阻害因子である請求の範囲第9項記載のコンジュゲート。
 11. x=1でありかつy=2またはそれより大である請求の範囲第9項記載のコンジュゲート。
 12. イオンのM対Pのモル比は0.1~1.000:1である請求の範囲第9項記載のスターバーストコンジュゲート。
 13. 薬物またはトキシンのM対Pの重量比は0.1~5:1である請求の範囲第9項記載のスターバーストコンジュゲート。
14.
$$(P) \times x (M) y \quad (1)$$

式中、各Pはデンドリマーを表わし、xは1またはそれより大きい整数を表わし、各Mは担持された製薬学的物質の単位を表わし、前記担持された製薬学的物質は同一の担持された製薬学的物質または異なる

担持された製薬学的物質であることができ、 y は1またはそれより大きい整数を表わし、そして*は前記担持された製薬学的物質が前記デンドリマーとアソシエーションしていることを示す、

を調製する方法であって、 P を M と、通常適当な溶媒中で、担持された物質(M)とスターバーストデンドリマー(P)とのアソシエーションを促進する温度において、反応させることからなる前記方法、

15、前記温度は室温ないし選定温度である請求の範囲第14項記載の方法、

16、前記適当な溶媒は、水、メタノール、エタノール、クロロホルム、アセトニトリル、トルエン、ジメチルスルホキシドまたはジメチルホルムアミドである請求の範囲第14項記載の方法、

17、また、少なくとも1種の存在する製薬学的に許容されうる希釈剤または組体を有する請求の範囲第1〜11項のいずれかに記載のスターバーストコンジュゲート、

18、また、存在する他の活性成分を有する請求の範囲第17項記載のスターバーストコンジュゲート組成物、

19、診断剤として使用するための請求の範囲第1〜11、17および18項のいずれかに記載のスターバーストコンジュゲート、

20、製薬学的組体として使用するための請求の範囲第1〜11、17および18項のいずれかに記載のスターバーストコンジュゲート、

21、少なくとも1種の担持された製薬学的物質を含有する請求の範囲第1〜11、17および18項のいずれかに記載の少なくとも1種のスターバーストコンジュゲートを、標的位置にまたはその付近に投与することを含んでなる前記少なくとも1種の担持された製薬学的物質を放

出する方法、

22、請求の範囲第4〜7項のいずれかに記載の標的ディレクターおよび標的部分を含有する2官能性スターバーストコンジュゲートを投与することを含んでなり、前記標的ディレクターは前記コンジュゲートを標的位置に局在化し、そして前記標的部分は二次的に投与される治療用化合物または診断用化合物と結合することができる、治療用化合物または診断用化合物を標的とする方法、

23、前記標的部分は、キレート剤、抗体または抗体である請求の範囲第22項記載の方法、

24、式

$$[(T)_a-(C')_b]_x * (P)_y * [(C'')_c]_h - (M)_v]_k \quad (III)$$

式中、

各 C' は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

各 C'' は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

a および b の各々は個々に1またはそれより大きい整数を表わし、

f および h の各々は個々に0またはそれより大きい整数を表わし、

$-$ は結合基が存在する場合共有結合を示し、

各 P はデンドリマーを表わし、

x は1またはそれより大きい整数を表わし、

T は標的ディレクターを表わし、

各 M は担持された製薬学的物質の単位(例えば、分子、原子、イオンおよび/または他の基本単位)を表わし、前記担持された製薬学的物質は同一の担持された製薬学的物質または異なる担持された物質であ

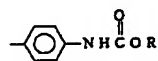
ることができ、好ましくは前記担持された製薬学的物質は生物活性因子であり、

y は1またはそれより大きい整数を表わし、そして

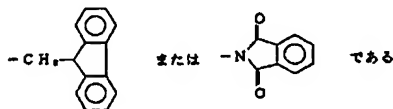
*は前記担持された製薬学的物質が前記デンドリマーとアソシエーションしていることを示す、

のスターバーストコンジュゲートを調製する方法であって、反応性部分を有する P を、保護された NH_2 基をもつことができ、結合基、例えば、アニリン部分と反応させることを含んでなる前記方法、

24、前記保護基は、式

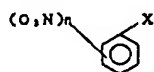


式中 R は $-C(CH_3)_3$ 、 $-CH_2-$ (benzene ring) である、



を有する請求の範囲第23項記載の方法、

25、 R は、また、式



式中、 n は1または2であり、そして X は F 、 Cl 、 Br 、 I 、 SO_3

Cl であり、そして n が1であるとき、 NO_2 基はパラ位置に存在する、の取り付けられた結合基(ハンドル)を有する請求の範囲第23項記載の方法、

26、前記結合基は4-フルオロニトロベンゼンである請求の範囲第25項記載の方法、

明 細 書

スターバーストコンジュゲート

本発明は、密なスターポリマー (dense star polymer) を製薬学的物質のための担体として使用することに関する。最近、密なスターポリマーまたはスターバーストポリマー (starburst polymer) と呼ぶポリマーが開発された。これらの密なスターポリマーまたはスターバーストポリマーの大きさ、形状および性質は、特殊化された最終用途の合致するように分子的に調整可能であることが発見された。ポリマーの単位につき高い濃度の担持された物質の放出 (delivery)、コントロールされた放出、ターゲテッド (targeted) 放出および/または多数の種の放出または使用のための手段を提供できるスターバーストポリマーは、有意な利点を有する。

その最も広い面において、所望の物質とアソシエーション (association) した密なスターポリマーまたはスターバーストポリマーを含み得るポリマーのコンジュゲート (conjugate) 物質 (以後、これらのポリマーのコンジュゲートを、しばしば、「スターバーストコンジュゲート」または「コンジュゲート」と呼ぶ)、これらのコンジュゲートを調製する方法、コンジュゲートを含有する組成物およびコンジュゲートおよび前記組成物を使用する方法に関する。

本発明のコンジュゲートは、特定の放出を望む種々の用途における使用に適して、とくに、生物学的に活性な因子の放出に適する。本発明の好ましい実施態様において、スターバーストコンジュゲートは1種または2種以上の生物活性因子とアソシエーションした1種または2種以上のスターバーストポリマーから構成されている。

第2A図は、非対称の(等しくない)枝の集合を有するデンドリマーを示す。

第2B図は、対称の(等しい)枝の集合を有するデンドリマーを示す。

第3図は、枝の寸法に関するデンドリマーの大きさを示す。

第4図は、種々のジェネレーションの中に組込まれたアスピリンについての図素-13のスピニング緩和時間(T1)を示す。(実施例1)

第5図は、実施例2の力学的分析の結果を示す。

第6図は、実施例2からのpH9.5におけるブソイドエフェドリンの遊離速度へのジェネレーション6.5のデンドリマーの影響を示す。

第7図は、実施例3のブソイドエフェドリンの遊離速度へのデンドリマーの加水分解の影響を示す。

実施例8は、pH5.0および6.5におけるスターバーストポリマー(G=4.0)の存在下にレセプター区画の中へ解放されたサリチル酸のパーセントとサリチル酸の対照との比較、実施例4、を示す。

第9図は、pH8.0におけるレセプター区画におけるスターバーストポリマー(G=4.0)を有する共有体区画から失われたサリチル酸のパーセントとサリチル酸の対照との比較、実施例4、を示す。

第10図は、スターバーストポリマー(G=4.5)の存在下に共有体区画から失われたサリチル酸のパーセントとサリチル酸の対照との比較、実施例4、を示す。

スターバーストポリマーは第1図によって図解され、ここで は開始コアを表わす(この図面において、3官能性開始コアは一番左の図に示されている); Zは末端基を表わし、最初の場合において左から2番目の図面に示されており、スターブランチド(starbranched)オリゴマー

スターバーストコンジュゲートは、スターバーストポリマーの有利な性質のために、この技術的に知られた他の担体を越えた有意な利益を提供する。スターバーストポリマーは、半偏方向の対称性をもつ規則正しい樹枝状の枝によって特徴づけられる、分子の構成を示す。これらの半偏方向に対称な分子は、「スターバーストの形態(starburst topology)」を有すると呼ばれる。これらのポリマーは、開始コア (initiation core) のまわりに同心の樹枝状の列 (concentric dendritic tier) を提供できる方法でつくられる。スターバーストの形態は、開始コアのまわりの同心の樹枝状の列で有機反復単位が整然として集成されることによって達成される; これは、ある数の分子のジェネレーション (generation) を通る幾何学的に進展する方法で、多重度 (multiplicity) および自己複製 (self-replication) を導入することによって(各列内で)達成される。得られる高度に官能化された分子は、それらの枝分れた(木に似た)構造ならびにそれらのオリゴマーの性質と異なり「デンドリマー (dendrimer)」と名付けられた。こうして、用語スターバーストオリゴマーおよびスターバーストデンドリマーは、用語スターバーストポリマー内に包含される。形態のポリマー、大きさおよび形状がコントロールされた領域をもつ、は、それらの反応性末端基を通して共有的に架橋されているデンドリマーであり、これらはスターバースト「架橋されたデンドリマー」と呼ばれる。用語架橋されたデンドリマーは、また、用語「スターバーストポリマー」の範囲内に包含される。図面の次の説明は、本発明の理解に役立つであろう。

第1図は、スターバーストデンドリマーの種々のジェネレーションを示す。

と呼ぶ; A、B、C、DおよびEはスターバーストデンドリマーの特定の分子のジェネレーションを表わす; そして(A)n、(B)n、(C)n、(D)nおよび(E)nはスターバースト架橋デンドリマーを表わす。

スターバーストデンドリマーは、3つの区別される構成の特徴、すなわち、(a) 開始コア、(b) 開始コアに半偏方向に取り付けられた反復単位から構成された内部の層 (ジェネレーション、G)、および(c) 最も外側のジェネレーションに取り付けられた末端の官能性(すなわち、末端の官能基)の外側表面、を有する単一の分子の集合体 (assembly) である。スターバーストデンドリマーの分子の大きさおよび形状およびデンドリマー分子中に存在する官能基は、開始コアの選択、デンドリマーをつくるとき使用するジェネレーション (すなわち、列 (tier)) の数、および各ジェネレーションで使用する反復単位の選択によってコントロールすることができる。デンドリマーは任意の特定のジェネレーションにおいて容易に単離することができるので、所望の性質を有するデンドリマーを得る手段が提供される。

スターバーストデンドリマーの成分の選択は、デンドリマーの性質に影響を及ぼす。開始コアのタイプは、デンドリマーの形状に影響を及ぼすことがあり、例えば、四角形円体のデンドリマー、円形または棒状のデンドリマー、楕円状のデンドリマー、またはマッシュルーム状のデンドリマーを生成する(開始コアの選択に依存して)。ジェネレーションの順次の組立て(すなわち、ジェネレーションの数および反復単位の数)は、デンドリマーの寸法およびそれらの内部の性質を決定する。

スターバーストデンドリマーは、枝の周辺に分布した官能基を有する

樹枝状の枝を含有する枝分れしたポリマーであるため、種々の性質をもつて調製できる。例えば、第2A図に示される高分子、およびスターバーストデンドリマー、例えば、第2B図に示すものは、枝の長さのため明確な性質を有することができる。第2A図に示すデンドリマーのタイプは非対称（等しくはセグメント）の枝の集合、外部（すなわち、表面）の基（Z'で表わされる）、内部の部分（Zで表わされる）を有するが、内部の空所の空間が非常に少ない。第2B図に示す好ましいデンドリマーのタイプは、表面の基（Z'で表わされる）をもつ対称（等しくはセグメント）の枝の集合、ジェネレーション（G）の間数として変化する内部の空所の空間をもつ2つの異なる内部の部分（それぞれXおよびZで表わされる）を有する。デンドリマー、例えば、第2B図に示すものは、十分なジェネレーションを通して、空所の空間を完全に閉じかつ含有して、主として中間の内部および高度の密集した表面をもつ実在因子（entity）を有する。また、スターバーストデンドリマーは、十分なジェネレーションを通して進展するとき、「スターバーストの密な充填」を示し、ここでデンドリマーの表面は十分な末端部分を含有し、こうしてデンドリマーの表面は密集するようになり、そしてデンドリマーの内部の空所の空間を取込む。この密集は分子のレベルのバリアーを提供することができ、そしてこのバリアーはデンドリマーの内部に入りあるいはそこから外に出る物質の拡散をコントロールするために使用できる。

デンドリマーの表面の化学は、前もって決定した方法で、所望の化学的官能性を含有する反復単位を選択することによって、あるいは新しい表面の官能性をつくる表面の官能性のすべてあるいは一部を化学的に変更することによって、コントロールすることができる。これらの表面は、

特定の部位に向かってターゲティングすることができるか、あるいは特定の細胞または細胞による、例えば、細胞内皮細胞による、吸収に対して抵抗性とすることができる。

スターバーストデンドリマーの別の使用において、デンドリマーは、それら自体、一緒に連結して、多樹枝状部分（スターバースト「集積デンドリマー」）をつくることができ、そしてこれらの多樹枝状部分は、また、組体として適する。

さらに、デンドリマーは特定のジェネレーションにおいて均一な枝分れからの変動を有するように調製することができ、こうして不連続性（すなわち、デンドリマー内の特定の位置における均一な枝分れからの変動）を付加する手段および異なる性質をデンドリマーに与えることができる。

本発明のスターバーストコンジュゲートにおいて使用するスターバーストポリマーは、技術的に知られている方法、例えば、米国特許第4,587,329号に従って調製することができる。

高度に均一な大きさおよび形状を有するデンドリマーを調製することができ、このようなデンドリマーは、最も重要には、デンドリマーの表面積の単位当りより大きい官能基の数を可能とし、そしてスターバーストポリマーと同一の分子量、同一のコアおよびモノマー成分、および同一のコアの枝分れの数を有する他のポリマーと比較して、分子の体積の単位当り、より大きい数の官能基を有することができる。密なスターバーストポリマーの官能基密度の増大は、デンドリマー当り、より大きい量の物質の担持を可能とする。デンドリマー使用の官能基の数は表面上においておよび内部においてコントロールできるので、それは、また、

デンドリマー当りに放出すべき生物活性因子の量をコントロールするための手段を提供する。本発明のとくに好ましい実施態様において、スターバーストポリマー、とくにスターバーストデンドリマーは、生物活性因子を特定の標的有機体に、あるいは標的有機体中の特定の決定基または位置に放出することのできる生物活性因子のターゲット組体（targeted carrier）である。

早期のジェネレーションのスターバーストデンドリマー（すなわち、ジェネレーション1〜7）および古典的球状ミセルとの間の類似を行うことができる。デンドリマーミセルの類似は、それらが球状して有する特徴、例えば、形状、大きさおよび表面を比較することによって誘導した。

び大きさ排除クロマトグラフィー（SEC）の測定によって評価した。表面の濃集の数は、タイタメトリー（titrimetry）および高い場のNMRによって評価した。面積（area）/表面の基はSECの流体力学的測定から計算した。

スターバーストポリアミドアミン（PAMAM）デンドリマーの最初の5つのジェネレーションは、ほとんどすべての図（すなわち、形状、大きさ、表面の基、および/または面積/表面の基）において古典的球状ミセルを非常に密接に模倣した微小領域（microdomain）である。しかしながら、主要な差は、それらがミセルの力学的に平衡化する性質に比べて共有的に固定しかつ強固であるということである。この差は、これらの微小領域をカプセル化装置として使用するとき、1つの有意な利点である。

5を超えてジェネレーションを同心的にさらに加えるとき、表面の密集化が起こる。この密集化は表面におけるバリアーの特性を増加させることができ、そして、表Iに示すように、それ自体ヘッド（表面）基当りより小さい表面積を要する。

表I

パラメーター	観測的な古典的ミセル	スターバーストデンドリマー
球状	球状	球状
大きさ（直径）	20〜60 Å	17〜67 Å
表面	4〜202	2〜6〜192（Zは表面の基の数である）（ジェネレーション=2〜7）
面積/表面の基	130〜80 Å ²	127〜75 Å ²

(Å²)

(1 Å = 10⁻¹⁰ m; 1 Å² = 10⁻²⁰ m²)

表Iにおいて、形状は走査透過型電子顕微鏡写真（STEM）および固有粘度（ η ）の測定によって評価した。大きさは固有粘度（ η ）およ

表1
デンドリマーの表面積とジェネレーション

ジェネレーション	1	2	3	4	5	6	7	8	9
表面積、Z	3	6	12	24	48	96	192	384	768
分子数	275	875	2411	5147	10,619	21,563	43,541	87,227	174,779
直径*	10.4Å	15.8Å	22Å	31Å	40Å	53Å	67Å	76Å	88Å
測定SEC									
表面積/デンドリマー	365Å ²	783Å ²	1519Å ²	3018Å ²	5024Å ²	8,820Å ²	14,096Å ²	18,135Å ²	36,083Å ²
表面積/7基	122Å ²	131Å ²	127Å ²	126Å ²	104Å ²	92Å ²	73Å ²	47Å ²	32Å ²
7基間の距離	12.4Å	12.8Å	12.7Å	12.6Å	11.5Å	10.8Å	9.8Å	7.75Å	6.25Å
空隙体積	311.6Å ³	1,470.2Å ³	4,737.9Å ³	11,427.0Å ³	-	-	-	-	-

* 単位体積に対して目盛り定めた最大溶解クロマトグラフィーの測定によつて決定した液体力学的直径

(注) ポリエチレンオキシドの値は、

$$\frac{1}{1A} = 10^{-11} \text{cm}^2; 1A = 10^{-10} \text{m}^2; 1A = 10^{-10} \text{m}^2$$

の進展したジェネレーションの段階で、共有的に固定されたリボソームのように挙動するように見える。この挙動は、これらの原型が、薬物放出因子として、あるいは種々の哺乳動物の病気の処置のためのスターバースト抗体コンジュゲートにおいて、非キレート化放射線核種のための担体として、働くことを可能とする。

本発明のコンジュゲートにおいて使用するために適当なデンドリマーは、米国特許第4,507,466号、米国特許第4,558,120号、米国特許第4,568,737号および米国特許第4,587,329号に記載されている密なスターポリマーまたはスターバーストポリマーである。

とくに、本発明は、少なくとも1単位の少なくとも1種の担持された製薬学的物質とアソシエーションして少なくとも1種のスターバーストポリマーを含んでなるスターバーストコンジュゲートに関する。本発明の範囲内に包含されるスターバーストコンジュゲートは、式：

式：

$$(P) \times (M) \quad (1)$$

式中、各Pはデンドリマーを表わし、

xは1またはそれより大きい整数を表わし、

各Mは担持された製薬学的物質の単位（例えば、分子、原子、イオンおよび/または他の基本単位）を表わし、前記担持された製薬学的物質は同一の担持された製薬学的物質または異なる担持された製薬学的物質であることができ、

yは1またはそれより大きい整数を表わし、そして

*は前記担持された製薬学的物質が前記デンドリマーとアソシエーシ

例えば、アミン末端ジェネレーション5, 0, 8, 0, 7, 0, 8, 0および9, 0は、それぞれ、104, 92, 73, 47および32人²の増加した表面積を有する。この特性は、より低く密化したミセル様表面から、通常小胞（リボソーム）またはラングミュアー・プロジェクト（Langmuir-Blodgett）型膜とアソシエーションした、より高く密化した2層/1層バリアー様表面への遷移に相当する。

この表面の密化が発生している場合、物理的特性および形態の変化は、中間のジェネレーション（6〜8）からより進行したジェネレーション（9または10）へのジェネレーションの増加として観察されるであろう。ジェネレーション7, 0, 8, 0および9, 0についての横断面透過電子顕微鏡写真（STEM）は、メタノール溶液を試料の各々から除去して無色、半黄色の固体のフィルムを得、そしてこれを四酸化オスミウムで着色することによって得た。予期した形態学的変化はジェネレーション9, 0の段階で起こった。ジェネレーション9, 0における微小領域は、直径が約33人²であると測定され、そして厚さが約25人²である無色のヘリによって囲まれている。明らかにメタノール溶液は25人²の外側の膜バリアー内の捕獲されて、暗色に着色された内部を考えた。こうして、ジェネレーション9, 0において、スターバーストPAMAMは形態的に小胞（リボソーム）のように挙動している。しかしながら、このスターバーストは、リボソームと比較して、大きさが1桁小さくかつ非常に単分散している。結局、本発明のデンドリマーは、直径が約33人²（体積約18,000人³）またはそれ以上の程度の大きさの、溶液充填された空隙の空間を分子的にカプセル化するために使用できる。これらのミセル大きさの原型（prototype）は、こ

ンしていることを示す、

によって表わされるものを包含する。

式(1)の好ましいスターバーストコンジュゲートは、Mが、薬物、放射性核種、キレート剤、キレート化金属、トキシン（toxin）、抗体、抗体断片、抗原、シグナル発生因子（signal generator）、シグナル反射因子（signal reflector）、またはシグナル吸収因子（signal absorber）であるもの、とくに好ましくはx=1であり、かつy=2またはそれより大であるものである。

また、スターバーストデンドリマーが、多樹枝状構成体（すなわち、X>1）を形成するように、必要に応じて連結基を介して、一緒に共有的に連結したスターバースト架橋デンドリマーである式(1)のスターバーストコンジュゲートが包含される。スターバースト架橋デンドリマーの使用は、局所的にコントロールされた解放因子（release agent）、放射線清膜切除剤などを包含する。

ここで使用するとき、「アソシエーションする（associated with）」は、1種または2種以上の担持された物質がデンドリマーのコア内にカプセル化または捕捉され、デンドリマーを通じて部分的にまたは完全に分散し、あるいはデンドリマーに取り付けられまたは連動されることができると、あるいはそれらの組み合わせを意味する。1種または2種以上の担持された物質（carried material）および1種または2種以上のデンドリマーのアソシエーション（association）は、必要に応じて、コネクター（connector）および/またはスペーサー（spacer）を使用して、スターバーストコンジュゲートの調製または使用を促進することができる。適当なコネクターの基（connecting group）は、ター

グティングディレクター (targeting director) (すなわち、T) の有効性またはスーパーストコンジュゲート中に存在する1種または2種以上の他の担持された物質 (すなわち、M) の有効性を有意に損傷しないで、ターゲティングディレクターをデンドリマー (すなわち、P) に連結 (link) する基である。これらのコネクターの基は、切離しが可能であるかあるいは不可能であることができ、そして典型的にはターゲティングディレクターとデンドリマーとの間の立体的障害を回避するように使用され、好ましくはコネクターの基は安定 (すなわち、切離し不可能) である。スーパーストデンドリマーの大きさ、形状および官能基の密度は厳格にコントロールできるので、担持された物質をデンドリマーのアソシエーションさせることのできる多くの方法が存在する。例えば、(a) 1種または2種以上の担持された物質とデンドリマーの表面にあるいはその付近に位置する、実在因子、典型的には官能基との間の、共有、クーロンの、疎水性またはキレート的なタイプのアソシエーションが存在することができ、(b) 1種または2種以上とデンドリマー内部に位置する部分との間の、共有、クーロンの、疎水性またはキレート的なタイプのアソシエーションが存在することができ、(c) デンドリマーは、担持された物質を内部 (空所の体積) 内に物理的に捕獲することを可能とするように、主として中空である内部を有するように調整することができ、ここで担持された物質の解放は、必要に応じて、デンドリマーの表面を拡散コントロール性部分と密集 (congesting) させることによって、必要に応じてコントロールすることができる；あるいは、(d) 前述の減少の種々の組み合わせを使用することができる。

175Yb, 177Lu, 88Y, 168Ho, 115In, 109Pd, 82Rb, 194Ir, 140Ba, 149Pm, 199Au, 140La, および188Re; シグナル発生因子、例えば、蛍光性実在因子; レグナル反射因子、例えば、常磁性実在因子、例えば、56Fe, Gd, 55Mn; キレート化金属、例えば、キレート剤とアソシエーションしたとき、それらが放射性であるか否かにかかわらず、上に記載した任意のもの; シグナル検出因子、例えば、電子ビーム不透明化剤; 抗体、例えば、モノクローナル抗体および抗イディオタイプ抗体; 抗体断片; ホルモン; 生物学的に反応性の修飾因子、例えば、インターロイキン、インターフェロン、ウイルスおよびウイルス断片; 診断用不透明化剤; および蛍光性部分。担持された製薬学的物質は、掃去因子 (scavenging agent)、例えば、キレート剤、抗原、抗体、あるいは治療用または診断用の因子を選択的に掃去できる他の部分を包含する。

好ましくは、担持された製薬学的物質は生物活性因子である、ここで使用するとき、「生物活性 (bioactive)」は、活性実在因子、例えば、分子、原子、イオンおよび/または他の実在因子を呼び、それらは、ターゲット (targeted) 実在因子、例えば、蛋白質、糖蛋白質、リポ蛋白質、脂質、ターゲット細胞、ターゲット器官、ターゲット有機体 [例えば、微生物または動物 (哺乳動物、例えば、ヒトを包含する)] または他のターゲット部分を検出、同定、阻害、処理、触媒、コントロール、殺す、増強または修飾 (modify) することができる。

式(1)のスーパーストコンジュゲートは、PをMと、通常適当な溶媒中で、担持された物質(M)とスーパーストデンドリマー(P)とのアソシエーションを促進する温度において、反応させることによ

デンドリマー、ここで「P」で表わす、は、米国特許第4,507,486号、米国特許第4,558,120号、米国特許第4,568,737号または米国特許第4,587,329号に記載されている密なスターポリマーを包含する。

担持された製薬学的物質、ここで「M」で表わす、は、次の物質を包含する: デンドリマーの物理的一体性を感知しうる程度に乱さず、密なスターポリマーとアソシエーションさせることのできる、診断または治療の処置のために生体内または生体外で使用する任意の物質、例えば、薬物、例えば、抗体、鎮痛剤、高血圧剤、強心剤など、アセトアミノフェン、アシクロビア (acyclovir)、アルケラン、アミカシン、アムピシリン、アスピリン、ビスアントレン、ブレオマイシン、ネオカージオスタチン、クロルアムブシル、クロルアンフェニコール、サイトアラビン、ダウノマイシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲンタマイシン、イブプロフェン、カナマイシン、メプロバメート、メトトレキサート、ノバントロン、ニスタチン、オンコビン、フェノバルビタール、ポリミキシン、プロブコール、プロカルバジン、リファンピシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、シメトレル、テオグアニン、トブラマイシン、トリメトプリム、バルバン; トキシン、例えば、ジフテリヤトキシン、グロニン、エクソトキシン A、アブリン、モデシン、リシン、またはそれらのトキシン断片; 金属イオン、例えば、アルカリ金属およびアルカリ土類金属; 放射性核種、例えば、アクチニドまたはランタニドまたは他の同様な遷移元素から、あるいは次のような他の元素から発生するもの、87Cu, 90Y, 111In, 131I, 186Re, 105Rh, 99mTc, 67Ga, 153Sm, 159Gd,

で調整される。

適当な溶媒は、PおよびMが少なくとも部分的に親和性でありかつコンジュゲートの生成に対して不活性である溶媒である。PおよびMが互いに少なくとも部分的に親和性である場合、溶媒は不必要である。必要となく、適当な溶媒の混合物を利用できる。このような適当な溶媒の例は、水、メタノール、エタノール、クロロホルム、アセトニトリル、トルエン、ジメチルスルホキシドまたはジメチルホルムアミドである。

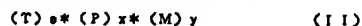
式(1)のスーパーストコンジュゲートの生成のための反応条件は、特定のデンドリマー(P)、所望の製薬学的物質(M)、および生成する結合(*)の性質に依存する。例えば、Pがメチレンカルボキシレート基をもつPEI (ポリエチレンジアミン) スーパーストデンドリマーであり、Mが放射性核種、例えば、イットリウムである場合、反応は室温において水中で実施される。しかしながら、Pがエステル末端PAMAMスーパーストデンドリマーであり、Mがアスピリンである場合、反応は室温においてクロロホルム中で実施する。典型的には、反応は室温ないし室温温度の範囲内であることができる。特定の溶媒および温度の選択は当業者にとって明らかであろう。

M:Pの比は、デンドリマーの大きさおよび担持された物質の量に依存する。例えば、イオンのM対Pのモル比(モルの比)は通常0.1~1.000:1、好ましくは1~50:1、より好ましくは2~6:1である。薬物またはトキシンのM対Pの重量比は通常0.1~5:1、好ましくは0.5~3:1である。

Mが放射性核種であるとき、スーパーストコンジュゲートを調整する3つの方法が存在する。すなわち、(1) Pをキレート剤として使用

できる。例えば、メチレンカルボキシレート、炭酸のPEIまたはPAMAMは金属、例えば、イットリウムまたはインジウムをキレート化するであろう。(2)キレートとPに共有的に結合することができる。例えば、アミン末端PEIスターバーストデンドリマーを1-(p-イソチオシアナトベンジル)ジエチレントリアミンペンタ酢酸と反応させ、次いでキレート化することができるか、あるいは複合体、例えば、イソチオシアナトベンジル-2,3,2'-etとキレート化した塩化ロジウムを反応させることができる。(3)前もってキレート化した放射性核種をPと疎水性またはイオンの相互作用によってアソシエーションさせることができる。

とくに好ましいスターバーストコンジュゲートは、標的ディレクター(ここで「T」と表示する)を含有しかつ式:



式中、

各Tは標的ディレクターを表わし、

xは1またはそれより大きい整数を表わし、そして

P、x、*、Mおよびyは前に定義した通りである、

によって表わされるコンジュゲートである。式(I)のスターバーストコンジュゲートのうちで、Mが、薬物、放射性核種、キレート剤、キレート化金属、トキシン、抗体、抗体断片、抗原、シグナル発生因子、シグナル反射因子、またはシグナル受取因子であるものは好ましい。また、好ましいコンジュゲートはx=1または2であるコンジュゲート、およびx=1でありかつy=2またはそれより大であるものである。とくに好ましいコンジュゲートは、x=1、y=2またはそれより大

であり、およびMおよびTがポリマーと同一もしくは相異なるコネクタを介してアソシエーションしているものである。

式(I)のスターバーストコンジュゲートは、T*Pを形成し、次いでMを加えることによって、あるいはP*Mを形成し、次いでTを加えることによって調製する。いずれの反応計画も、特定のコンジュゲートの成分に悪影響を及ぼさない反応において、かつ必要なとき適当な溶媒の存在下に、実施する。pHをコントロールするために、緩衝剤または適当な酸または塩基の添加を用いる。反応条件は、形成するアソシエーション(*)のタイプ、使用するスターバーストデンドリマー(P)、保持された薬理学的物質(M)、および標的ディレクター(T)に依存する。例えば、Tがモノクローナル抗体でありかつMが放射性核種であるとき、T*Pのアソシエーションは、官能基、例えば、イソチオシアネートを通じて、水中で、あるいは有機溶剤、例えば、アセトニトリルまたはジメチルホルムアミドおよび水の中で、実施する。通常、コンジュゲーション(conjugation)は緩衝液中でpH7~10、好ましくはpH8.5~9.5において実施する。次いで、形成したコンジュゲートを放射性核種、例えば、酢酸イットリウムと、好ましくは室温においてキレート化する。あるいは、PおよびMは、通常水中で、Tへのコンジュゲーション前に、キレート化することができる。Tとのコンジュゲーションは適当な緩衝液中で実施する。

T:Pの比は、ことにTが抗体または断片であるとき、好ましくは1:1である。M:Pの比は前の通りであろう。

スターバーストコンジュゲートをターゲティング(targeting)できる標的ディレクターは、本発明のスターバーストコンジュゲートにおい

て使用したとき、スターバーストコンジュゲートの少なくとも一部を所望の標的(例えば、蛋白質、糖蛋白質、リポ蛋白質、脂質、ターゲット細胞、ターゲット組織、ターゲット有機体または他のターゲット部分)に放出する実在因子であり、そして抗体、好ましくはモノクローナル抗体、抗体断片、例えば、Fab、F(ab')₂断片または要求する標的の特異性を有する他の抗体断片、ホルモン、生物学的に反応性の修飾因子;標的の特異性を示す化学的官能基などを包含する。

ここに記載する好ましいスターバーストコンジュゲートにおいて使用できる抗体または抗体断片は、この分野においてよく知られた技術によって調製できる。高度の特異的なモノクローナル抗体は、この分野においてよく知られたハイブリダイゼーション技術、例えば、コウラー(Kohler)およびミルスタイン(Milstein) [1975、ネイチャー(Nature) 256:495-497;および1976、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Eur. J. Immunol.) 6:511-518]、によって生成することができる。このような抗体は通常高度に特異的な反応性を有する。

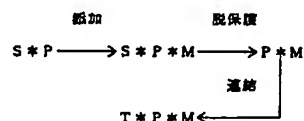
抗体ターゲットスターバーストコンジュゲートにおいて、抗原またはハプテンに対して向けられた抗体を使用できる。普通のポリクローナル抗体を使用できるが、モノクローナル抗体はいくつかの利点を提供する。各モノクローナル抗体は単一のエピトープに対して高度に特異的である。さらに、大量の各モノクローナル抗体を生成することができる。本発明において使用する抗体は、例えば、腫瘍、バクテリア、真菌(fungi)、ウイルス、寄生虫、マイコプラズマ、分化および他の細胞膜抗原、病原性表面抗原、トキシン、酵素、アレルギー、薬物および生物学

的に活性な分子に対して向けることができる。抗原のより完全なリストについては、米国特許第4,193,983号を参照。

さらに抗体または断片をデンドリマーに結合すること、および特定の場において、異なる特異性の抗体を結合することが望ましいことがある。例えば、腫瘍を局在化しかつその結合し、次いで循環する細胞毒性化合物、診断の化合物または生体動力学的化合物を掃去する能力を有する2官能性コンジュゲートを設計することができる。

標的ディレクターの不在下(または必要に応じて標的ディレクターの存在下)に、デンドリマーの表面にあるいはその付近に位置できる官能基の数のために、このような官能基のすべてまたは実質的な部分を、アニオン性、カチオン性または疎水性として、反対電荷の所望の標的へ、あるいは疎水性もしくは親水性の適合性標的へ、スターバーストコンジュゲートを放出することを効果的に促進することができる。

保護されたハンドル(handle)(S)をもつPを使用する式(I)のコンジュゲートの調製は、また、式(I)のコンジュゲートを調製するための1つの方法として意図する。この反応の概要を下に示す:



ここで、

S*Pは保護されたデンドリマーを表わし、

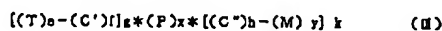
S*P*MはMとコンジュゲーションした保護されたデンドリマーを表わし、

P*MはM(スターバーストコンジュゲート)とコンジュゲーションした dendrimer を表わし、そして

T*P*Mは標的ディレクターに連結したスターバーストコンジュゲートを表わす。

P*Mに影響を及ぼさない適当な溶媒を使用できる。例えば、Sが1-ブトキシカルバメートであるとき、Sは水性酸によって除去することができる。

また、ポリマーが直接に、あるいはコネクターを介してアソシエーションしているスターバーストコンジュゲートを調製する；これらのスターバーストコンジュゲートは、式：



式中、

各C'は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

各C''は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

gおよびkの各々は個々に1またはそれより大きい整数を表わし、

fおよびhの各々は個々に0またはそれより大きい整数を表わし、

—は結合基が存在する場合共有結合を示し、そして

P、x、*、M、y、Tおよびaは前に定義した通りである。

式(III)のスターバーストコンジュゲートのうち、Mが、放射性核種、薬物、トキシン、シグナル発生因子、シグナル反因子またはシグナル受容因子であるものは好ましい。また、x=1であるものは好ましいコンジュゲートである。とくに好ましいコンジュゲートは、x、a、f、hおよびyの各々が1であり、gが1またはそれより大であり、そしてkが各々独立に2またはそれより大きいものである。x、a、f、h、yおよび

値した通りである。

標的ディレクター(targeting director)(T)との連結に有効な官能基(C'またはC'')を有するスターバースト dendrimer (P)の上の合成のために、好ましい方法は反応性官能性が合成前駆体として保護されることを必要とする。この保護は非常に高い品質の dendrimer またはコンジュゲートの合成を可能とするので、好ましい。この方法は、そうでなければ、また、連結官能基との反応を生じ、こうして標的ディレクター(T)への取り付けを不可能とするであろう方法において、1単位の担持された製薬学的物質(M)をスターバースト dendrimer (P)の末端官能基への化学的結合を可能とする。引続く脱保護または所望の連結官能基への合成的転化は、こうして、スターバーストコンジュゲートの標的ディレクターへの連結を可能とする。

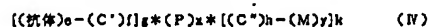
好ましい「連結(linking)のための官能基」(以後「ハンドル」と呼ぶ)の1つは、アニリン部分である。この基は標的ディレクターへの連結に直接使用できるか、あるいは標的ディレクターとの反応に適当な他の官能基、例えば、イソチオシアネート、イソシアネート、セミチオカルバジド、セミカルバジド、プロモアセトアミド、ヨードアセトアミドおよびマレイミドに容易に変更できるので、好ましい。アニリン部分はスターバースト dendrimer の合成において使用するために容易に保護することができるので、また、標的ディレクターとの連結のためのハンドルとして好ましく、あるいはニトロ基を前駆体として使用でき、次いでこれを合成の終りにて所望のアミノ官能基に転化することができる。

スターバースト dendrimer の合成の間にアニリノアミノ官能性を保

びgの各々が1であり、そしてkが2またはそれより大きいコンジュゲートは最も好ましい。また、Mが生物活性因子、例えば、放射性核種、薬物またはトキシンを表わすスターバーストコンジュゲートはとくに好ましい。

C''によって表わされる適当な結合基は、担持された製薬学的物質の有効性またはスターバーストコンジュゲート中に存在する標的ディレクターの有効性を有意に損傷しないで、担持された製薬学的物質を dendrimer に連結する基である。これらのコネクターは、担持された製薬学的物質の活性のモードに依存して、安定(すなわち、切離し不可能)または切離し可能でなくてはならず、そして、典型的には、担持された製薬学的物質とポリマーとの間の立体障害を回避するために使用される。

dendrimer が直接にあるいはコネクターを介して、抗体または抗体断片にアソシエーションしているコンジュゲートは最も好ましい。これらの好ましいコンジュゲート中のポリマーは、さらに、必要に応じて直接にあるいはコネクターを介して、1種または2種以上の担持された物質、好ましくは放射性核種にアソシエーションできる。このようなスターバーストコンジュゲートは、式：



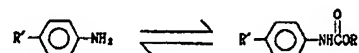
式中、

各抗体は所望のエピトープと相互作用できる抗体または抗体断片を表わし、

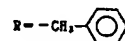
—は結合基が存在する場合共有結合またはクローンの結合を示し、そして

P、x、*、M、T、a、y、C'、C''、g、k、fおよびhは前に定

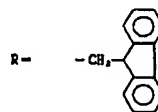
義するために適当な、ある数の保護基が存在する。[参照、テオドラ(Teodoro) W. グリーン(Green)、有機合成における保護基(Protective Groups in Organic Synthesis)、発行、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ・インコーポレーテッド(John Wiley & Sons, Inc.)、ニューヨーク、1981]。保護基の好ましいクラスは、下に示すカーバメートである。



多くのカーバメートがアミンの保護に使用されてきている。スターバースト dendrimer の合成に最も好ましいカーバメートは1-ブトキシカルバメート、 $R = -C(CH_3)_2-$ である。脱保護は穏和な酸加水分解によって達成される。ベンジルカルバメート保護基、

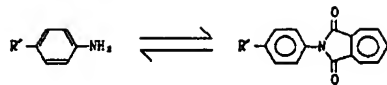


は、また、好ましく、これは dendrimer が酸加水分解に感受性であるとき好ましい。脱保護は接触水素化によって達成される。また、9-フルオレンニルメチルカルバメート、



は好ましい。

フタルイミド保護基、例えば、



は、また、好ましい。

文献においてよく知られているアミンのために使用される他の保護基は、また、この合成の計画において使用できる。使用の好ましさは、例示として与えただけであり、使用できる保護基のみではない。反応条件下に安定でありかつスターバースト dendリマーの一体性を変更しないで除去できる保護基を使用できる。

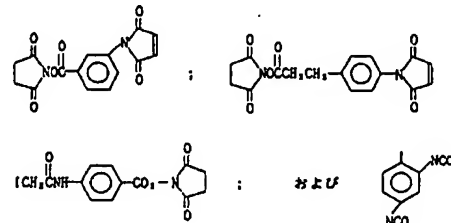
上の方法は、アミノフェニル官能性をアミノ基含有因子の中に入ることができる。次いでこれをある生物活性因子、例えば、モノクローナル抗体または酵素とコンジュゲーションすることができる。この因子は随時的カップリング (coupling) によって生物活性因子、例えば、抗体の上の炭水化物へコンジュゲーションすることができる。アミノフェニル基は、また、生物活性因子上のリジン残留物のペンダント (pendant) アミノ基との引続く反応のために、イソナオンアネートまたはイソシアネートに転化することができる。

別の方法は、活性化ハロゲン化アリール、例えば、4-ニトロフルオロベンゼン、と、コンジュゲーションのための因子、例えば、スターバーストポリエチレニミン (PEI)、の上のアミノ官能との反応、および引続くコンジュゲーションのためのニトロ基のアニリン官能性への引続く接触水素化を包含する。それは因子、例えば、ポリアミンのためにとくに有用であり、これは、すべての非還元性反応の条件に対して

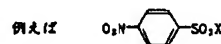
この方法は、また、分子の残部と明確に区別可能であるハンドルを導入する。マナベ (Manabe) らは、残留アミンによるコハク酸脱水物の開環がカップリング基を与え、これを通して抗体へのコンジュゲーションが可能であることを開示した。しかしながら、この方法は、キレート剤が連結基と同一であるので、ポリマー上のキレート化しない部位の間を区別する手段を与えなかった。

本発明の方法は、また、好ましくは PEI アセテート dendリマーにより、スターバースト dendリマーを使用するランタニドの直接の合成を提供する。対照的に、デンケウェルター (Denkewalter)、米国特許第 4, 289, 872 号は、表面上のアセテートの適切な配置がはたらくことを述べている。しかしながら、本発明の反応は、PEI アセテートが PAMAM より非常によくはたらく、すなわち、イミノアセテートの表面はこの物語の一部のみであり、主鎖および枝分れの性質は同様に非常に重要であることを示す。PEI アセテートは PAMAM アセテートよりもすぐれたキレート化性質を有する。

ニトロフェニル官能性の相対的の化学的不活性のために、使用前にそれ以上の修飾に必要である。より普通の 2 官能性基因子、例えば、活性なエステルまたはジイソシアネート (これらは多数の反応条件下に反応性でありかつそれらをコンジュゲーションのために使用不可能とするであろう) は、次のものを包含する：

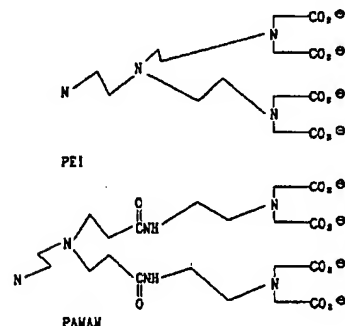


本発明は、また、ニトロ置換アリールスルホンハライドを使用して、例えば、スルホンアミド、



を生成することを包含する。

コンジュゲーションのためにアミノフェニル基を導入する既知の方法を越えたこの方法の利点は、それが合成の後期の段階で起こることである。ガンショウ (Gansow) ら、米国特許第 4, 472, 509 号は、彼の方法において、ニトロフェニル基を長い合成の手順の最初の段階で導入し、これによって利用可能な化学について制限を有する。



式 (IV) のスターバーストコンジュゲートのうちで、M が、放射性核種、薬物、トキシン、シグナル発生因子、シグナル反射因子またはシグナル伝達因子であるものは好ましい。また、 $x=1$ であるコンジュゲートは好ましい。 x, a, f, h および y の各々が 1 であり、 g が 1 またはそれより大であり、そして k の各々が 2 またはそれより大であるコンジュゲートはとくに好ましい。 x, a, f, h, y および k の各々が 1 であり、そして g が 2 またはそれより大であるコンジュゲートは最も好ましい。また、「抗体」がモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合性断片を表わすスターバーストコンジュゲートはとくに好ましい；M が生物活性因子、例えば、放射性核種、薬物またはトキシンを表わすものはとくに好ましい。

スターバーストコンジュゲートは、種々の生体外または生体内の診断、例えば、ラジオイムノアッセイ、核磁気共鳴分光分析、コント

ラスト撮影 (contrast imaging) およびイメージンググラフィー (imaging) のため、分析的应用、治療的应用において、抗体、放射性核種、薬物または病変の状態、例えば、癌、自己免疫病、中枢神経系の疾患、伝染病および心臓疾患の処置における使用に際する他の因子の担体として使用することができ、あるいは他の有用な因子の製造のための出発物質として使用できる。

本発明は、また、スターバーストコンジュゲートが他の適当なビヒクルと配合されたスターバーストコンジュゲート組成物に関する。スターバーストコンジュゲートの組成物は、必要に応じて、他の活性成分、添加剤および/または希釈剤を含有する。

本発明のスターバーストコンジュゲートにおいて使用するために好ましいスターバーストポリマーは、コアから発する、少なくとも1つの枝分れ（以後、コアの枝分れと呼ぶ）、好ましくは2またはそれより多い枝分れを有するスターバーストポリマーとして記載することができるポリマーであり、前記枝分れは少なくとも1つの末端基を有し、ただし（1）末端基のコアの枝分れの比は1より大であり、好ましくは2またはそれより大であり、（2）ポリマーにおける単位体積当りの末端基の密度は、同様なコアおよびモノマー部分および四散する分子数および数のコアの枝分れを有する延長した従来のスターポリマーのそれの少なくとも1.5倍であり、延長した従来のスターポリマーのこのような枝分れの各々は1つだけの末端基を有し、そして（3）分子の体積は、日盛付きコウレイ・パウリング (Corey-Pauling) の分子モデルを使用する手法の研究によって決定して、前記延長した従来のスターポリマーの分子体積の約80%より多くない。ここで使用するとき、用語「密な」は、

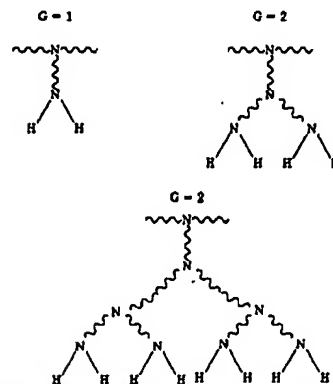
「スターポリマー」または「デンドリマー」を修飾するとき、それが同一の分子量を有する延長した従来のスターポリマーより小さい分子体積を有することを意味する。密なスターポリマーと比較するためのベースとして使用する延長した従来のスターポリマーは、密なスターポリマーと同一の分子量、同一のコアおよびモノマー成分および同一の数のコアの枝分れを有するものである。「延長した (extended)」とは、従来のスターポリマーの個々の枝分れがそれらの最大の長さに延長または伸張されていること、例えば、スターポリマーがそのための理想の溶媒中に完全に溶媒和されているとき、このような枝分れが存在することを意味する。さらに、末端基の数は従来のスターポリマーの分子よりも密なスターポリマーの分子について大きい、末端基の化学的構造は同一である。

本発明のコンジュゲート中に使用するデンドリマーは、この分野において知られている方法によって調製できる。上のデンドリマー、種々の共反応成分およびコア成分、およびそれらの調製方法は、米国特許第4,587,329号におけるように定義することができる。

本発明のコンジュゲート中に使用するためのデンドリマーは、付加反応および置換反応を行なうために十分に反応性である末端基を有することができる。このような末端基の例は、アミノ、ヒドロキシ、メルカプト、カルボキシ、アルケニル、アリル、ビニル、アミド、ハロ、炭素、オキシラニル、アジリジニル、オキサゾリニル、イミダゾリニル、スルホナト、ホスホナト、イソシアナトおよびイソチオシアナトを包含する。末端基は修飾して、それを生物学的に不活性とすることができ、例えば、それを免疫原性とすることができ、あるいは肝臓、脾臓または他の

器官における非特異的吸収を回避することができる。デンドリマーは従来のスターまたはスター枝分れポリマーと異なり、デンドリマーは等しい数のコアの枝分れおよび等しいコアの枝分れの長さを有する従来の延長したスターポリマーよりも、分子体積の単位当りの末端基の密度が大きい。こうして、デンドリマー中の単位体積当りの末端基の密度は、通常、従来の延長したスターポリマーにおける末端基の密度の少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも5倍、より好ましくは少なくとも10倍、最も好ましくは15~50倍である。密なポリマー中のコアの枝分れ当りの末端基の比は、好ましくは少なくとも2、より好ましくは少なくとも3、最も好ましくは4~1024である。好ましくは、所定のポリマーの分子量について、密なスターポリマーの分子体積は、従来の延長したスターポリマーの分子体積の70%より小、より好ましくは18~60%、最も好ましくは7~50%である。

本発明のコンジュゲート中に使用する好ましいデンドリマーは、樹枝状の枝に共有結合した1個または多量のコアを有するとして特徴づけられる。このような規則正しい枝分れは次の順序によって例示され、ここでGはジェネレーションの数を表わす：



数学的には、樹枝状の枝使用の末端基の数（#）および枝分れのジェネレーションの数との間の関係は次のように表わすことができる：

末端基の# / 樹枝状の枝 =

$$\frac{Nr^G}{2}$$

式中、Gはジェネレーションの数であり、Nrはアミンの場合において少なくとも2である反復単位の数（multiplicity）である。デンドリマー中の末端基の合計の数は、次によって決定される：

$$\frac{NcNr^G}{2}$$

式中、GおよびNrは上に定義した通りであり、そしてNclはコア化合物の原子価（しばしばコアの官能性と呼ばれる）を表わす。したがって、

本発明のデンドリマーはその成分部分において次のように表わすことができる：

$$\left\{ \left(\text{反復単位} \right) \frac{N_r G - 1}{N_r - 1} \text{ 末端部分 } N_r G \right\} N_0$$

式中、コア、末端部分、GおよびNは上に定義した通りであり、そして反復単位は $N_r + 1$ の原子個または官能性を有し、ここで N_r は上に定義した通りである。

本発明の目的に対して好ましいデンドリマーであるコポリマーのデンドリマーは、高度に枝分れた（樹枝状の）列（array）で多官能性モノマー単位から構成された独特の化合物である。デンドリマーの分子は、多官能性開始単位（コアの化合物）、多官能性反復単位および末端単位から構築され、そして末端単位は反復単位と同一であるかあるいは異なることができる。コアの化合物は式①（Z'） N_0 によって表わされ、ここで①はコアを表わし、Z'は①に結合した官能基であり、そしてNはコア官能性を表わし、この官能性は好ましくは2またはそれより大であり、最も好ましくは3またはそれより大である。こうして、デンドリマー分子はある数（ N_0 ）の官能基、Z'、に結合した多官能性コア、①、からなり、それらの各々は第1ジェネレーションの反復単位、 $X'Y'(Z')N'$ 、の単官能性テイル（tail）に化合物しており、1つのジェネレーションの反復単位のZ基の各々は、末端のジェネレーションに到達するまで、次のジェネレーションの反復単位の単官能性テイルに結合している。

デンドリマーの分子において、反復単位は単一のジェネレーション内

$$\left(\text{①}(Z')N_0 \right) \left\{ \left(X'Y'(Z')N' \right) \frac{N_r - 1}{N_r} \right\}^{i-1} \left(X'Y'(Z')N' \right) \frac{N_r - 1}{N_r}$$

iは1〜i-1であり、そして記号は前に定義した通りである、

によって表わされる分子式を有する。N関数はその規定された境界の間のすべての値の積である。こうして、

$$\prod_{n=1}^{i-1} N' = (N')^i (N')^{i-1} \cdots (N')^2 (N')^1$$

は1つの樹枝状の枝の第i番目ジェネレーションからなる、反復単位、 $X'Y'(Z')N'$ 、の数であり、そしてiが1であるとき、

$$N' = 1$$

$$n = 1$$

コポリマーのデンドリマーにおいて、1つのジェネレーションのために反復単位は少なくとも1つの他のジェネレーション中の反復単位から異なる。好ましいデンドリマーは、下に記載する構造式に例示するように非常に対称である。好ましいデンドリマーは他の試薬との接触によって官能化されたデンドリマーに転化することができる。例えば、酸塩化物との反応によって末端のジェネレーション中のヒドロキシルのエステルへの転化は、エステル末端官能化デンドリマーが得られる。この官能化は利用可能な官能基の数によって規定される理論的最大限度まで実施する必要はなく、こうして、官能化されたデンドリマーは、好ましいデンドリマーの場合におけるように、非常に高い対称性または精確に規定された分子式を有しないことがある。

ホモポリマーのデンドリマーの場合において、反復単位、 $X'Y'(Z')$

で同一であるが、ジェネレーションごとに異なることができる。反復単位、 $X'Y'(Z')N'$ 、において、 X' は第1ジェネレーションの反復単位の単官能性テイルを表わし、 Y' は第1ジェネレーションを構成する部分を表わし、 Z' は第1ジェネレーションの反復単位の多官能性ヘッド（head）の官能基を表わし、そしてコアの化合物、①（Z'） N_0 、または他のジェネレーションの官能基と同一であるか異なることができる；そして N' は2またはそれより大きい、好ましくは2、3または4の数であり、これは第1ジェネレーションにおける反復単位の多官能性ヘッドの多重度を表わす。一般に、反復単位は式 $X'Y'(Z')N'$ によって表わされ、式中「i」は第1からi-1ジェネレーションまでの特定のジェネレーションを表わす。こうして、好ましいデンドリマー分子において、第1ジェネレーションの反復単位の各Z'は第2ジェネレーションの反復単位の X' に結合しており、そしてジェネレーションを通して進行して、ジェネレーションの数「i」における反復単位 $X'Y'(Z')N'$ についての各Z'基はジェネレーションの数「i+1」の反復単位のテイル（ X'^{i+1} ）に結合している。好ましいデンドリマー分子の最後または末端は末端単位、 $X'Y'(Z')N'$ からなり、式中iは末端のジェネレーションを表わし、そして X' 、 Y' 、 Z' および N' は X' 、 Y' 、 Z' および N' と同一であるかあるいは異なることができ、ただしZ'基に結合した連続するジェネレーションは存在せず、そして N' は2より小さく、例えば、0または1であることができる。したがって、好ましいデンドリマーは、

N' 、のすべては同一である。すべての N の値は等しい（ N_r として定義して）ので、反復単位の数を表わす積の関数は簡単な指数の形になる。したがって、分子式は次のようにいっそう簡単な式で表わすことができる：

$$\left(\text{①}(Z')N_0 \right) \left\{ \left(X'Y'(Z')N' \right) \frac{N_r - 1}{N_r} \right\}^{i-1} \left(X'Y'(Z')N' \right) \frac{N_r - 1}{N_r}$$

式中、 $i = 1 \sim i-1$ である。

この形は、なお、各々が $N_r N_r^{i-1}$ 反復単位、 $X'Y'(Z')N'$ 、から成る、異なるジェネレーション間の区別を示す。ジェネレーションを1つ項に結合すると、次が得られる：

$$\left(\text{①}(Z')N_0 \right) \left(X'Y'(Z')N' \right) \frac{N_r^{i-1} - 1}{N_r - 1} \left(X'Y'(Z')N' \right) \frac{N_r^{i-1} - 1}{N_r - 1}$$

または

$$\left(\text{①}(Z')N_0 \right) \left\{ \left(X'Y'(Z')N' \right) \frac{N_r^{i-1} - 1}{N_r - 1} \right\} \left(X'Y'(Z')N' \right) \frac{N_r^{i-1} - 1}{N_r - 1}$$

コア 反復単位 末端単位

式中、 $X'Y'(Z')N'$ はすべてのジェネレーションにおいて使用する反復単位である。

結局、ポリマー化合物がこれらの上の式に適合する場合、ポリマーはスターバーストポリマーである。逆に、ポリマー化合物がこれらの上の式に適合しない場合、ポリマーはスターバーストポリマーではない。また、ポリマーがスターバーストポリマーであるか否かを決定するため、

それを調製するために用いた方法を知る必要はなく、それが上の式に合致するかどうかのみを知ればよい。これらの式は、また、デンドリマーのジェネレーション (G) または列形成 (ilirine) を立証している。

明らかなように、P * M のアソシエーションが起こる方法および場所に依存する。因子 (M) 対デンドリマー (P) の比を決定するためにいくつかの方法が存在する。内部のカプセル化が存在するとき、M : P の重量比は通常 10 : 1、好ましくは 8 : 1、より好ましくは 5 : 1、最も好ましくは 3 : 1 である。この比は 0.5 : 1 ~ 0.1 : 1 程度に低いことができる。内部の化学量論を用いるとき、M : P の重量比は内部にカプセル化についてと同一である。外部の化学量論を用いるとき、M : P のモル/モルの比は次の式によって与えられる：

	M	:	P
(A)	5 NcNtNr ²⁻¹		1
(B)	3 NcNtNr ²⁻¹		1
(C)	1 NcNtNr ²⁻¹		1

ここで Nc はコアの多重度を意味し、Nt は末端基の多重度を意味し、そして Nr は枝の接合の多重度を意味する。NcNtNr²⁻¹ の項は 2 重の数を生ずるであろう。こうして、例えば、上の (A) は蛋白質、酵素または高度に帯電した分子が表面上に存在するとき、生ずることができ、上の (B) はそれがアスピリンまたはオクタン酸であるとき、生ずることができ、そして上の (C) は炭素のエステル基をカルボキシレートイオンまたは基に転化するとき、生ずることができ。

もちろん、種々のデンドリマーの他の構造体は、当業者によれば、使用するデンドリマーの成分およびジェネレーションの数を適宜に変化さ

り、枝の半径 (その完全に延長した形態で) を有し、それは同一分子量のデンドリマーよりも非常に大きいであろう。このタイプの線状ポリマーは、多くの受入れられたターゲティング成分の分子の認識性質に悪影響を及ぼすことが期待されるであろう。また、コンジュゲートは、例えば、Fab、Fab' または他の適当な抗体断片を低分子体積のデンドリマーにカップリングすることによって、遊出 (extravasation) をディスカレッジ (discourage) しないように、最小の分子量をもつことが望ましい。

デンドリマーは、小さい体積の空間内のある数の金属イオンをキレート化する能力をもつため、放射性核種または強く常磁性の金属イオンを腫瘍部位に放出するための望ましい。腫瘍に対して特異的な抗体または抗体断片へのカップリングは、抗体に対して単一の修飾で、抗体当りある数の金属を放出することができる。

標的ディレクター (target director) をデンドリマーへ連結することは、本発明の他の面である。本発明の好ましい実施形態において、とくに抗体を標的ディレクターとして使用する場合、反応性官能基、例えば、カルボキシル、スルフヒドリル、反応性アルデヒド、反応性オレフィン基誘導体、イソチオシアナト、イソシアナト、アミノ、反応性アールハライド、または反応性アルキルハライドをデンドリマーについて便利に用いることができる。反応性官能基は、既知の技術、例えば、次の技術を使用してデンドリマーに導入することができる：

(1) 異なる反応性の官能基を内部に組込んで有するヘテロ官能性開始剤 (デンドリマーを合成するための出発物質として) の使用。このようなヘテロ官能性開始剤において、官能基の少なくとも 1 つはデンドリ

マーの形成のために開始部位として働き、そして他の官能基の少なくとも 1 つは標的ディレクターへの連結に利用可能であるが、デンドリマーの合成を開始するために使用可能である。例えば、保護されたアニリンの使用は、アニリンの NH₂ を反応させないで、分子内の NH₂ 基のそれ以上の修飾を可能とする。

標的ディレクターへの連結に利用可能である官能基は、3 つの形態の 1 つにおいて開始剤分子の一部であることができる；すなわち：

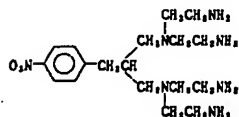
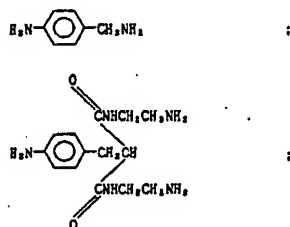
- それを標的ディレクターとの連結において使用する形態において。これは、デンドリマーの合成に含まれる合成の工程のいずれもこの中心において反応を生じることができないとき、可能である。
- ターゲティングディレクターへの連結のために使用した官能基がデンドリマーの合成に含まれる合成工程において反応性であるとき、それは保護基を使用することによって保護することができ、その保護基は含まれる合成の手順に対してその基を非反応性とするが、それ自体高分子の残部の一体性を変更しない方法で容易に除去できる。
- ターゲティングディレクターとの連結のために使用すべき反応性の官能基のために簡単な保護基を形成できない場合、デンドリマーの合成において使用する合成手順のすべてにおいて非反応性である合成の前駆体を使用することができる。合成が完了したとき、この官能基は、この分子の残部の一体性を変更しない方法で、所望の連結基に容易に転化することができなくてはならない。

(2) 所望の反応性官能基を前もって形成した dendrimer 上にカップリング (共有的に) するとき、使用する試薬は dendrimer の末端官能基と容易に反応する官能性を含有しなくてはならない。ターゲティング因子と連結するために究極的に使用すべき官能基は、その最終の形態において、保護された官能性として、あるいは合成の前駆体として存在することができる。この連結官能性を使用する形態は、利用すべき合成手順の間のその一体性、およびこの基を連結のために利用可能とするために必要な条件に最終の高分子が耐えることのできる能力に依存する。例えば、PBI について好ましいルートは、



を使用する。

上の (1) において使用するためのヘテロ官能性開始剤の例は、次の例示的例を包含する:

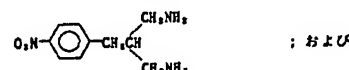
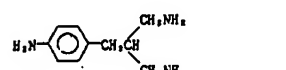
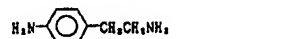
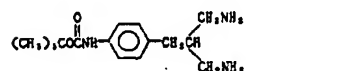
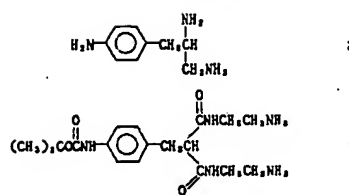
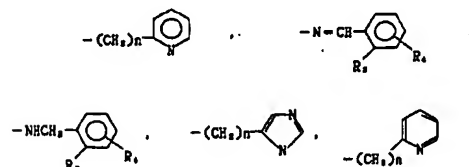
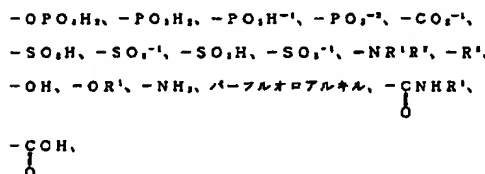


とくに重要ないくつかの化学が存在する:

- 1) スターバーストポリアミドアミド (「PAMAM」) の化学;
- 2) スターバーストポリエチレンジアミン (「PEI」) の化学;
- 3) PAMAM の表面をもつスターバーストPEI化合物;
- 4) スターバーストポリエーテル (「PE」) の化学。

dendrimer の表面の官能性の修飾は、他の有用な官能基、例えば、

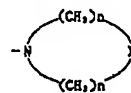
次のものを提供できる:



式中、

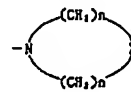
R はアルキル、アリールまたは水素を表わし、

R¹ はアルキル、アリール、水素、または



を表わし、

R² はアルキル、アリール、または



を表わし、

R³ は $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, または $-\text{SO}_3\text{H}$ を表わし、

R⁴ はアルキル、アリール、アルコキシ、ヒドロキシ、メルカプト、カルボキシ、ニトロ、水素、ブロモ、クロロ、ヨード、またはフルオロを表わし、

R⁵ はアルキルを表わし、

X は NR⁶, O または S を表わし、そして

n は 1, 2 または 3 の値を表わす;

ポリエーテル; または他のイミノ不感受性部分。

官能基の選択は、dendrimer を設計するための特定の最終用途に依

存する。

抗体のデンドリマーへの連結は本発明の他の面である。典型的には、抗体または抗体断片は、この分野においてよく知られている技術により、例えば、デンドリマー上の官能基と抗体または抗体断片中に存在する部分、例えば、炭水化物、アミノ、カルボキシルまたはスルフィドリル官能基との間の結合によって、デンドリマーへ連結することができる。ある場合において、結合基はデンドリマーと抗体または抗体断片との間のコネクターまたはスペーサーとして使用できる。抗体または抗体断片へのデンドリマーの取り付けは、抗体または抗体断片の免疫活性を誘発の妨害しない方法で、すなわち、抗原認識部位および結合部位の一部でない抗体または抗体断片中の官能性を介して、抗体または抗体断片を結合することによって実施すべきである。

次の実施例により、本発明をさらに説明するが、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。文字の実施例は出発物質の調製に関し、そして数字の実施例は生成物の調製に関する。

実施例A

2-カルボキシアミド-3-(4'-ニトロフェニル)-プロパンアミドの調製

p-ニトロベンジルマロネートジエチルエステル(2.4g, 8.13ミリモル)を35mlのメタノール中に溶解した。この溶液を50~55℃に加熱しながら加熱し、そして無水アンモニアの流れをこの溶液を通じて84時間泡立てて通入した。この溶液を冷却し、白色の凝集した生成物を通し、そして225mlの沸騰するメタノールから再結晶化すると、1.85g(7.80ミリモル)のビスアミドが96%の収率で得

られた(融点=235.8℃(分解))。構造はMS、¹Hおよび¹³C NMR分光分析によって確認された。分析: C₁₈H₁₇N₃O₅について計算

構造はMS、¹Hおよび¹³C NMR分光分析によって確認された。

分析: C₁₈H₁₇N₃O₅について計算

	C	H	N
理論値:	42.57	8.07	14.89
計算値:	43.00	8.14	15.31

実施例C

1-アミノ-2-(アミノメチル)-3-(4'-アミノフェニル)プロパンの調製

ボラン/テトラヒドロフラン溶液(70ml, 70ミリモル)を、4-アミノベンジルマロニアミド(1.5g, 7.24ミリモル)を含むフラスコに溶解しながらカニューレで真空下に添加した。この溶液を40時間還流させた。無色の溶液を冷却し、そして過剰のテトラヒドロフランを回転蒸発によって除去すると、透明なゼラチン様物が得られた。メタノール(50ml)をこの油に注意して添加し、ガスの発生が認められた。乾燥塩化水素をこの懸濁液中に泡立てて通入して溶解を実施し、次いでこの溶液を1時間還流した。メタノール/HClを回転蒸発し、そして得られる塩酸塩を同一の溶解/還流手順に再び通した。得られた塩酸塩を10mlの水中に溶解し、そして水溶液中でアルゴン下に冷却した。無水酸化ナトリウム(50%)をゆっくりと添加してpH=11にした。次いで、この水溶液を2×100mlの部分のクロ

られた(融点=235.8℃(分解))。

構造はMS、¹Hおよび¹³C NMR分光分析によって確認された。

分析: C₁₈H₁₇N₃O₅について計算

	C	H	N
理論値:	50.63	4.89	17.72
計算値:	50.75	4.81	17.94

実施例B

1-アミノ-2-(アミノメチル)-3-(4'-ニトロフェニル)プロパンの調製

2-カルボキシアミド-3-(4'-ニトロフェニル)プロパンアミド(2.0g, 8.43ミリモル)を、35mlの乾燥テトラヒドロフラン中で窒素の雰囲気下に溶解しながらスラリー化した。この混合物にボラン/テトラヒドロフラン溶液(100ml, 100ミリモル)を注射器で添加した。次いで、この反応混合物を48時間還流加熱し、その後過剰のアミドは溶解した。この溶液を真空冷却し、そしてテトラヒドロフランを回転蒸発で真空除去した。粗生成物およびボランの残留物を無水塩化水素ガスでパージした。この溶液を1時間還流し、そして溶液を真空除去した。粗製の塩酸塩を15mlの脱イオン水中に溶解し、2×50ml部分の塩化メチレンで抽出した。水性相を水浴中でアルゴンのブランケットの下で冷却し、そして50%の無水酸化ナトリウムを塩基性pH=11.7となるまでゆっくりと添加した。塩基性の水相を4×25mlの部分の塩化メチレンで抽出し、そしてこれらの一層にした抽出液を蒸発(回転)すると、1.45gの琥珀色の油が得られた。この油をジエチルエーテル(50ml)で粉砕し、そして短いシリカゲル(等級62ア

ロホルムで抽出し、これらを一緒にし、そして乾燥せずに短いシリカゲルのプラグを通して通した。溶液を真空(回転)除去すると、無色化合物(0.90g, 5.02ミリモル)が70%の収率で得られた(Rf=0.65-CHCl₃/MeOH/NH₄OH=2/2/1)。この構造はMS、¹Hおよび¹³C NMRによって確認され、そしてそれ以上精製しないで使用した。

実施例D

8-(4'-アミノベンジル)-1,4,8,11-テトラアザ-5,7-ジオキサウンデカンの調製

4-アミノベンジルマロネートジメチルエステル(2.03g, 8.43ミリモル)を10mlのメタノール中に溶解した。この溶液を10mlのメタノール中の新しく蒸留したエチレンジアミン(8.00g, 103.4ミリモル)の攪拌した溶液に、窒素下に2時間かけて滴下添加した。この透明溶液を4日間攪拌し、そして薄層クロマトグラフィー(TLC)分析はジエステル(Rf=0.91)がビスアミド(Rf=0.42-20%の濃NH₄OH/80%のエタノール)に完全に転化したことを示した。この物質は強くニンヒドリン陽性であった。メタノールおよび過剰のジアミンを回転蒸発で除去し、そして得られた白色固体を一夜真空(10⁻⁴mm, 50℃)乾燥すると、粗生成物(2.45g, 8.36ミリモル)が99%の収率で得られた。分析試料をクロロホルム/ヘキサンから再結晶化した。融点160-161℃。質量分析、¹Hおよび¹³C NMRのデータは提案する構造と一致した。

実施例E

メシルアジリジンと1-アミノ-2-(アミノメチル)-3-(4-

ニトロフェニル) プロパンとの反応

1-アミノ-2-(4-アミノメチル)-3-(4-ニトロフェニル)プロパン(400mg, 1.91ミリモル, >96%の純度)を、10.5mlの無水エタノール中に室温下に溶解した。メチルアジリジン(950mg, 7.85ミリモル)を攪拌したジアミン溶液に固体として添加した。得られた反応混合物を25℃で14時間磁気攪拌機を使用して攪拌し、そしてこの期間の間に白色のゴム状反応溶液がフラスコの側面に形成した。エタノールをデカンテーションし、そして残留物を他の15mlの部分のエタノールで粉砕して未反応のアジリジンを除去した。ゴム状生成物を真空(10⁻¹mm, 25℃)乾燥すると、テトラキスメチルスルホンアミド(1.0g, 1.44ミリモル)が75%の収率(Rf=0.74-NH₄OH/エタノール-20/80)で得られた。構造はMS、¹Hおよび¹³C NMRによって特性づけられた。

実施例F

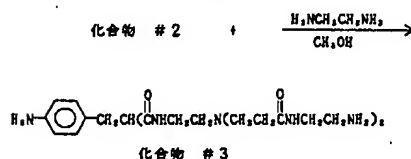
2-(4-ニトロベンジル)-1,3-(ビス-N,N-アミノエチル)ジアミノプロパンの調製

粗製メチルスルホンアミド(850mg, 0.94ミリモル)を5mlの室温でパージした塩酸(98%)中に溶解した。この溶液を室温下に攪拌し、そして143~146℃に27分間加熱して攪拌しながら加熱した。わずかの褐色化が認められ、そして冷却した溶液をエーテル(80ml)の攪拌した溶液中に注いだ。沈殿した白色凝集物をろ過し、そして10mlの脱イオン水中に逐ちに溶解した。この溶液のpHを5.0%のNaOHでアルゴン下で冷却しながらpH=11に調整した。得られる溶液を90mlのエタノールと混合し、そして沈殿した無機物をろ過した。

そして攪拌しながらメチルアクリレートの溶液に2時間かけてゆっくり添加した。この反応混合物を48時間周囲温度において攪拌した。溶液を40℃以下の温度に維持した回転蒸発器で除去した。エステル(化合物#2)が黄色油(2.8g)として得られた。アニリン官能のカルボエチル化は観察されなかった。

実施例H

次の反応式によって表わされる1.5ジェネレーションのスーパーポリマー(アニリン部分を含有する)の調製

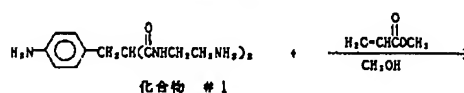


エステル(化合物#2)(2.8g, 3.7ミリモル)をエタノール(100ml)中に溶解した。これをエチレンジアミン(250g, 4.18ミリモル)およびメタノール(100ml)の攪拌した溶液に、温度が40℃を越えないような速度で、注意した添加した。添加の完結後、この反応混合物を35~40℃(加熱マントル)で28時間攪拌した。28時間後、赤外分光分析によってエステル基は検出できなかった。溶液を回転蒸発器で60℃において除去した。トルエン-メタノール-エチレンジアミンの3成分共沸蒸留によって、過剰のエチレンジアミンを除去した。最後にすべての残留するトルエンをメタノールとともに共沸蒸留した。すべてのメタノールを除去すると、3.01gの生成物(化

合物#1)がオレンジ色のガラス状固体として得られた。この混合物を攪拌し、そして残留するトルエンが淡黄色を獲得するまで(ボット中に30~40mlが残留する)水を共沸蒸留(ディーン-スタークのトラップ)により除去した。トルエンを冷却し、そして褐色の取扱いにくい残留物および塩からデカンテーションした。この溶液から溶液を真空ストリッピングし、そして得られる淡黄色の油を一夜真空乾燥(0.2mm, 35℃)すると、210mgの生成物(80%)が得られ、これをMS、¹Hおよび¹³C NMRによって特性づけた。

実施例G

次の反応式によって表わされる0.5ジェネレーションのスーパーポリマー(アニリン誘導体を含有する)の調製

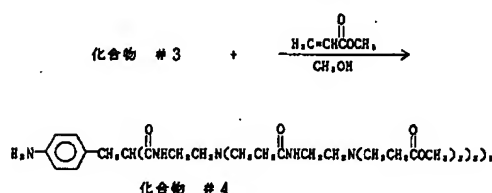


メチルアクリレート(2.09g, 24ミリモル)をメタノール(15ml)中に溶解した。化合物#1-(4-アミノベンジル)-1,4,8,11-テトラアザ-5,7-ジオキサウンデカン(1.1g, 3.8ミリモル)(すなわち、化合物#1)をメタノール(10ml)中に溶解し、

化合物#3)がオレンジ色のガラス状固体として得られた。

実施例I

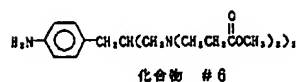
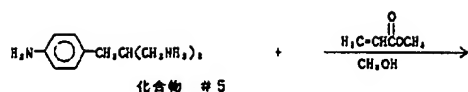
次の反応式によって表わされる1.5ジェネレーションのスーパーポリマー(アニリン部分を含有する)の調製



アミン(化合物#3)(2.7g, 3.8ミリモル)をメタノール(7ml)中に溶解し、そしてメタノール(15ml)中のメチルアクリレート(3.8g, 44ミリモル)の攪拌した溶液に周囲温度において1時間かけてゆっくり添加した。この溶液のわずかの加熱が添加の間に観察された。この溶液を周囲温度で16時間攪拌した。溶液を回転蒸発器で40℃において除去した。すべての溶液および過剰のメチルアクリレートの除去後、エステル(化合物#4)が4.5gの収率でオレンジ油として得られた。

実施例J

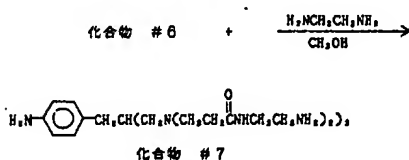
次の反応式によって表わされる0.5ジェネレーションのスーパーポリマー(アニリン部分を含有する)の調製



トリアミン（化合物#5、この化合物の調製は実施例Cに示されている）（0.42g、2.3ミリモル）をメタノール（10ml）中に溶解し、そしてメタノール（10ml）中のメチルアクリレート（1.98g、23ミリモル）に1時間かけて滴下添加した。この混合物を周囲温度で48時間攪拌した。溶液を40℃より高くない温度に維持した回転蒸発器で除去した。過剰のメチルアクリレートを反復したメタノールとの共沸蒸留によって除去した。エステル（化合物#6）はオレンジ色油（1.24g）として単離された。

実施例K

次の反応式によって表わされる1.5ジェネレーションのスターバーストポリマー（アニリン部分を含有する）の調製



し、次いでメタノールとの共沸蒸留を反復すると、すべての過剰のメチルアクリレートを除去できた。真空ポンプで48時間ポンピングすると、エステル（化合物#8）がオレンジ色油（2.58g、1.8ミリモル）として単離された。

実施例M

4.5ジェネレーションのデンドリマーの加水分解およびカルシウム塩の調製

4.5ジェネレーションのPAMAM（エステル末端、NH₂で開始された）（2.11g、10.92ミリ当量）を25mlのメタノール中に溶解し、そしてこれに10%のNaOH（4.37ml、10.92ミリ当量）（pH=11.5~12）を添加した。室温で24時間後、pHは約9.5であった。さらに20時間後、この溶液を回転蒸発し、50mlのトルエンを添加し、そして再び回転蒸発した。

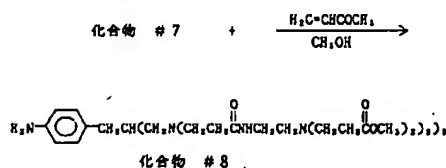
得られる油を25mlのメタノール中に溶解し、そして75mlのジエチルエーテルを添加すると、白色ガムとして沈殿した。液体をデカンテーションし、そしてガムを回転蒸発すると、非常に微細な灰色の粉末が得られ、これをさらに乾燥すると、2.18gの生成物（98%の収率）が得られた。エステル基はNMRおよび赤外分析で発見されなかった。

4.5ジェネレーションのPAMAMのナトリウム塩（エステル末端、NH₂で開始された）をカルシウム塩の代わりに使用した。このナトリウム塩（1.03g）を100mlの水中に溶解し、そして中空繊維の透析チューブ（カットオフ=5000）に3ml/分で通過させた。チューブの外側は5%のCaCl₂溶液中に浸漬した。次いで、この手順を反復した。

エステル（化合物#6）（1.24g、2.3ミリモル）をメタノール（50ml）中に溶解し、そしてメタノール（100ml）中のエチレンジアミン（73.4g、1.22モル）に2時間かけて滴下添加した。わずかの発熱が認められ、激しい攪拌を維持した。この溶液を周囲温度で72時間攪拌したまま放置した。溶液を回転蒸発器で60℃において除去した。トルエン-メタノール-エチレンジアミンの3成分共沸蒸留によって、過剰のエチレンジアミンを除去した。最後に、すべての残留するトルエンをメタノールとともに除去し、次いで真空ポンプで48時間トルエンでポンピングすると、アミン（化合物#7）（1.86g）が黄色/オレンジ油として得られた。

実施例L

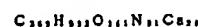
次の反応式によって表わされる1.5ジェネレーションのスターバーストポリマー（アニリン部分を含有する）の調製



アミン（化合物#7）（1.45g、微量のメタノールが残留した）をメタノール（100ml）中に溶解し、そしてメタノール（20ml）中のメチルアクリレート（5.80g）の攪拌した溶液に1.5時間かけてゆっくり添加した。この溶液を室温で24時間攪拌した。溶液を除去

得られた溶液を再び透析し、この時は水に対してして透析し、次いでさらに2回反復した。

蒸発する0.8gの湿った固体が得られ、これをメタノール中に対して（完全に可溶性でない）そして乾燥すると、0.45gの灰色結晶が得られた。



計算値 - 10.10%のCa⁺⁺

不純=9526.3 計算値=C-4432.1、H-601.8、O-2255.9

理論値：C-46.5、H-6.32、N-13.38、Ca-10.10

実測値：C-47.3、H-7.00、N-13.55、Ca-8.83

実施例N

末端カルボキシレート基をもつデンドリマーの調製

0.5ジェネレーションのスターバーストポリアミドアミンを加水分解して、それらの末端メチルエステル基をカルボキシレートの酸化した。これにより、周辺上に分散した陰性の電荷をもつ、回転楕円形の分子が発生した。加水分解したデンドリマーは0.5ジェネレーション（3カルボキシレート）ないし6.5ジェネレーション（192カルボキシレート）の範囲であった。

生成物はNa⁺、K⁺、Ca⁺⁺またはRb⁺として発生させることができた。

実施例O

N-1-ブトキシカルボニル-4-アミノベンジルマロネートジメチ

ルエステル

4-アミノマロネートジメチルエステル(11.62g, 49ミリモル)を、50mlのn-ブタノール:水(60:40)中に攪拌しながら溶解した。ジ-n-ブトキシジカーボネート(19.79g, 90ミリモル)を添加し、そしてこの反応混合物を一夜攪拌した。ブタノールを回転蒸発器で除去すると、水中の生成物の黄色懸濁液が得られた。塩化メチレン中に抽出し、乾燥(MgSO₄)しそして蒸発すると、黄色油(21.5g, ジ-n-ブトキシジカーボネートで汚染されている)が得られた。2-プロパノール:水(75:25)から再結晶化すると、淡黄色結晶(11.1g, 33ミリモル, 67%)が得られた。この¹³C NMRによって確認され、そして純度はHPLC分析[スフェリスorb(Spherisorb) ODS-1, 0.05モルのH₃PO₄, pH3:CH₃CN 55:45]により検査した。この材料をそれ以上精製しないで使用した。

実施例P

N-n-ブトキシカルボニル-6-(4-アミノベンジル)-1,4,8,11-テトラアザ-5,7-ジオキソウンデカン
N-n-ブトキシカルボニル-4-アミノベンジルマロネートジメチルエステル(8.82g, 25ミリモル)、実施例Oにおけるように調製した、を50mlのメタノール中に溶解した。この溶液を、新しく蒸留したエチレンジアミン(188g, 3.13ミリモル)および20mlのメタノールの溶液、窒素雰囲気下に濁々(2時間)濁々添加した。この溶液を24時間攪拌した。エチレンジアミン/メタノール溶液を回転蒸発器で除去した。生成物をメタノール中に溶解し、そしてトルエンを添

8,11-テトラアザ-5,7-ジオキソウンデカン(5.0g, 13ミリモル)、実施例Pにおけるように調製した、を100mlのメタノール中に溶解した。メチルアクリレート(6.12g, 68ミリモル)を添加し、そしてこの溶液を周囲温度で72時間攪拌した。この反応をHPLC(スフェリスorb ODS-1, アセトニトリル:0.04モルの酢酸アンモニウム 60:40)によって監視して、所望生成物への転化を最適化した。この溶液を30%の固体に濃縮し、そしてメチルアクリレートA(3.0g, 32ミリモル)を添加した。この反応混合物を周囲温度で、アルキル化生成物がHPLCによって検出できなくなるまで(24時間)、攪拌した。溶液を30%で回転蒸発によって除去し、そして1mmHgで24時間ポンピングすると、生成物が黄色粘性油として得られた、収量7.81g。¹³C NMRデータは提案する構造と一致した。生成物はそれ以上精製しないで使用した。

実施例R

N-n-ブトキシカルボニル-6-(4-アミノベンジル)-1,4,8,11-テトラアザ-5,7-ジオキソウンデカンからの1ジェネレーションのスターバースト dendromer の調製
0.5ジェネレーションの生成物(実施例Q)(7.70g, 10.45ミリモル)を75mlのメタノール中に溶解し、そしてエチレンジアミン(400ml, 7.41モル)およびメタノール(50ml)の攪拌した溶液に2時間かけて濁々添加した。この反応混合物を周囲温度で48時間攪拌した。エチレンジアミンおよびメタノールを回転蒸発によって除去すると、黄色油(11.8g, エチレンジアミンで汚染されている)が得られた。生成物を90mlのメタノール中に溶解し、そして逆接造(フ

加した。溶液を回転蒸発器で除去すると、素生成物が白色固体(10.70g, エチレンジアミンで汚染されている)が白色固体として得られた。この試料を2つの試料に精製のために分割した。トルエンとともにエチレンジアミンを共沸蒸留除去し、シンプル中にスルホン化イオン交換ビーズを含むソクスレー抽出器を使用してエチレンジアミンを除去すると、生成物は部分的に分解して褐色油が得られた。残留する生成物はトルエンから冷却すると白色固体として単離された(2.3g, ほぼ50%)。メタノール中の10%溶液をガスクロマトグラフィー(カラム、テナクス60/80)により分析すると、試料中にエチレンジアミンは検出限使用であった(<0.1%)。第2分画をメタノール中に溶解して10重量%の溶液を形成し、そしてエチレンジアミンから溶液としてメタノールして逆接造することによって精製した。[使用した膜はフィルムテック(Filmetec) FT-30, アミコン(Amicon) TC1Rの薄いチャンネルのセパレーター、エチレンジアミンはこの膜を換切る。]生成物は白色固体(2.7g)として単離され、この中に検出可能な量のエチレンジアミンはガスクロマトグラフィーによって発見できなかった。¹³C NMRのデータおよびHPLC分析(スフェリスorb ODS-1, 0.05モルのH₃PO₄, pH3:CH₃CN 55:45)は提案した構造と一致した。この生成物をそれ以上精製しないで使用した。

実施例Q

N-n-ブトキシカルボニル-6-(4-アミノベンジル)-1,4,8,11-テトラアザ-5,7-ジオキソウンデカンからの0.5ジェネレーションのスターバースト dendromer の調製
N-n-ブトキシカルボニル-6-(4-アミノベンジル)-1,4,

フィルムテックFT-30膜およびアミコンTC1R薄いチャンネルのセパレーター、溶液としてメタノール)によってエチレンジアミンから精製した。48時間後、エチレンジアミンはガスクロマトグラフィー(カラム、テナクス60/80)によって検出できなかった。溶液を回転蒸発器によって除去し、真空ラインで24時間ポンピングすると、生成物は黄色ガラス状固体として得られた(6.72g)。HPLC(PLRP-Sカラム, アセトニトリル:0.015モルのNaOH, 10~20%の勾配, 20分)による分析および¹³C NMR分析は、提案した構造と一致した。

実施例S

N-n-ブトキシカルボニル-6-(4-アミノベンジル)-1,4,8,11-テトラアザ-5,7-ジオキソウンデカンからの1.5ジェネレーションのスターバーストポリマーの調製
1ジェネレーションの生成物(実施例R)(2.14g, 25ミリモル)を12.5mlのメタノール中に溶解し、そして5mlのメタノール中のエチレンジアミン(3.5g, 39ミリモル)を添加した。この溶液を周囲温度で48時間攪拌し、反応の進行をHPLC(スフェリスorb ODS-1, アセトニトリル:0.04モルの酢酸アンモニウム 60:40)によって監視した。メチルアクリレートの第2アリコート(3.5g, 39ミリモル)を添加し、そしてこの反応混合物を周囲温度で72時間攪拌した。溶液を回転蒸発器で除去すると、生成物が黄色油(3.9g)として、真空ポンプによる一夜のポンピング後、得られた。この生成物をそれ以上精製しないで使用した。

実施例T

N-1-ブトキシカルボニル-6-(4-アミノベンジル)-1,4,8,11-テトラアザ-5,7-ジオキサソウンデカンからの2完全ジェネレーションのスターバーストポリマーの調製

1.5ジェネレーションの生成物(実施例S)(3.9g、2.5ミリモル)を50mlのメタノール中に溶解し、エチレンジアミン(600g、10モル)およびメタノール(50ml)の攪拌した溶液に2時間かけて滴下添加した。この溶液を周囲温度で窒素の雰囲気中で8時間攪拌した。エチレンジアミン/メタノールを回転蒸発器で除去すると、黄色のガラス状固体(4.4g、エチレンジアミンで汚染されている)が得られた。この生成物の10%の溶液をメタノール中でつくり、そしてエチレンジアミンがガスクロマトグラフィー(カラム、テナクス60/80)によって検出されなくなるまで、逆浸透(フィルムテックPT-30として使用した膜、アミコンTC1R薄いチャンネルのセパレーター中)によってエチレンジアミンから精製した。溶媒を除去すると、生成物は黄色のガラス状固体(3.52g)として得られた。13C NMRデータおよびHPLC(PLRP-S、カラム、アセトニトリル:0.015NaOH、10~20%の勾配、20分)は、提案した構造と一致した。

実施例U

2ジェネレーションのスターバーストとプロモ酢酸とのメチレンカルボキシレート末端スターバーストデンドリマーを製造する反応

第2ジェネレーションの生成物(実施例T)(0.22g、0.133ミリモル)を15mlの脱イオン水中に溶解し、そして温度を40.5℃に平衡化した。プロモ酢酸(0.48g、3.5ミリモル)および水

の溶液に、25.0gのトリス(2-アミノエチル)アミンを添加した。この溶液を室温で4日間攪拌した。水を反応混合物に必要に応じて添加して、溶液の均質性を維持した。溶媒を真空蒸留により除去すると、第2ジェネレーションのスターバーストPEI-メタンスルホンアミドが黄色ガラス(161g)として得られた。

実施例X

第2ジェネレーションのスターバーストポリエチレンジアミンを形成するためのメタンスルホンアミドの切離し

20mlの38%のHCl中の5.0gの第2ジェネレーションのスターバーストPEI-メタンスルホンアミド、実施例Wから、の溶液をガラスアンブル中に密閉した。このアンブルを160℃に18時間加熱し、次いで水浴中で冷却し、そして開いた。溶媒を真空蒸発によって除去し、そして残留物を水中に溶解した。この溶液のpHを10より大または10に50%のNaOHで調整した後、溶媒を真空蒸留によって除去した。トルエン(150ml)を残留物に添加し、そしてこの混合物をディースタークトラップの下に、水がもはや除去されなくなるまで、還流加熱した。この溶液をろ過して塩類を除去し、そしてろ液を真空除去すると、1.9gの第2ジェネレーションのスターバーストPEIが黄色油として得られた。

実施例Y

第3ジェネレーションのスターバーストポリエチレンジアミン-メタンスルホンアミドの調製

100mlのエタノール中の10.1gのスターバーストPEI、実施例Xから、の溶液に、36.6gのN-メタンスルホンアジリジン

酸化リチウム(0.13g、3.3ミリモル)を5mlの脱イオン水中に溶解し、そして反応混合物に添加した。反応のpHは、pHスタット(Stat)(0.1NのNaOHで滴定を使用して、40.5℃で一晩注意して9に維持した。逆相HPLC(スファリスノーブODS-1、溶離剤0.025モルのH₃PO₄[NaOH]:アセトニトリル 85:15)の監視は、主として単一の成分の合成を確認した。

実施例V

イソチオシアナト官能化第2ジェネレーションのメチレンカルボキシレート末端スターバーストデンドリマーの調製

5mlの2.8ミリモルの第2ジェネレーションのメチレンカルボキシレート末端スターバーストデンドリマー(実施例U)を20mlの水で希釈し、そしてpHを緩衝液で0.5に調整した。室温において1時間後、この混合物をHPLCにより分析して、ブトキシカルボニル基の除去を評価し、次いで50%の水酸化ナトリウムで処理してpHを7にした。pHスタット(Stat)(0.1NのNaOHによる滴定)を使用してpH7に維持し、そして225μlのチオホスゲンを添加した。室温において15分後、この混合物のpHを1NのHClで5に調整した。この混合物をクロロホルム(20ml×2)で洗浄し、次いで減圧下で回転蒸発器で濃縮した。0.91gの回収された残留物はイソチオシアネートと塩類との混合物である。

実施例W

第2ジェネレーションのスターバーストポリエチレンジアミン-メタンスルホンアミドの調製

50mlのエタノール中の125gのN-メタンスルホンアジリジン

を添加した。この溶液を室温で1週間攪拌した。水を必要に応じて添加して、この溶液の均一性を維持した。溶媒を真空蒸留によって除去すると、第3ジェネレーションのスターバーストPEI-メタンスルホンアミドが黄色ガラス(45.3g)として得られた。

実施例Z

第3ジェネレーションのスターバーストポリエチレンジアミンを形成するためのメタンスルホンアミドの切離し

第3ジェネレーションのスターバーストPEI-メタンスルホンアミド(5.0g)、実施例Yから、メタンスルホンアミド基を、実施例Xにおける第2ジェネレーションの物質について記載したのと同一の手順によって除去して、2.3gの第3ジェネレーションのスターバーストPEIを黄色油として得られた。

実施例AA

第3ジェネレーションのスターバーストポリエチレンジアミンと4-フルオロ-2-ニトロベンゼンとの反応

第3ジェネレーションのスターバーストポリエチレンジアミン(実施例Z)(1.08g、1.2ミリモル)を12mlの無水エタノール中に溶解した。(4-フルオロ)-2-ニトロベンゼン(120μl、1.2ミリモル)を添加し、そして反応混合物を一晩還流加熱した。溶媒を回転蒸発器で除去し、そして得いた黄色を水中に溶解した。水溶液をクロロホルムで洗浄して、未反応の(4-フルオロ)-2-ニトロベンゼンを除去した。水を除去すると、生成物が深黄色油(0.80g)として得られた。13C NMRスペクトルは提案した構造と一致した。(統計学的分布の性質を鑑照する試みをしなかった。)生成物はそれ以上精製しないで使用した。

実施例B B

第3ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンのニトロフェニル誘導体とグリコニトリルとの反応

第3ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンのニトロフェニル誘導体(AA)を、20mlの脱イオン水中に溶解した。水酸化ナトリウム(2.80g、50%w/w)を保持した溶液に添加し、そしてこの溶液を窒素でバージし、水酸化ナトリウムのスターバーを通して抽出した。グリコニトリル(2.85mlの70%の水溶液)を周囲温度において添加した。黄色の沈殿は数分後に形成することが観察された。2時間後、温度をゆっくり還元まで上昇させ、そして溶液を窒素でバージしながら還元温度に24時間維持した。水を除去すると、生成物はグリコール酸および水酸化ナトリウムで汚染された黄色固体として得られた。¹³C NMRスペクトルは提案した構造と一致していた。生成物は精製しないで使用した。

実施例C C

ニトロフェニル誘導体のアミノフェニルメチレンカルボキシレート末端第3ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンへの加水分解

実施例B Bからの黄色固体(1.70g)を10mlの脱イオン水中に溶解し、生じた溶液のpHはほぼ1であった。木炭担持パラジウム(200mgの5%Pd/C)を、ガラス製ボール(Parr)びん中の反応混合物に添加した。反応混合物を40psi(275kPa)の水素圧下に置き、そしてボール水素化装置内で周囲温度において8時間反応させた。次いで、この反応混合物を0.5μmのミリポア(Millipore)フィルターでろ過し

10mlの脱イオン水中に溶解し、そしてpHを5NのNaOHでpHスケールを使用して9.7に調整した。この反応をこのpHに30分間維持し、そして温度を80℃にゆっくり上昇させ、80℃に3時間一定のpHにおいて維持した。pHは10.3に上昇し、そしてこの反応混合物をpHスケールの制御下に周囲温度において一夜維持した。反応混合物をさらに4時間還元させた後処理した。溶液を除去し、そして最後の少量の水をメタノールとともに共沸蒸留すると、生成物が淡黄色粉末(8.7g、異化ナトリウムで汚染されている)として得られた。¹³C NMRスペクトルは提案した構造と一致していた(多少のモノアルキル化の結果として、少量の欠陥物質のために多少の汚染を伴っていた)。

実施例F F

メチレンカルボキシレート末端第2ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンの調製(アンモニアから開始した)

第2ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミン(2.73g、6.7ミリモル)、実施例Xから、およびプロモ酢酸(1.29g、81ミリモル)を30mlの脱イオン水中に溶解した。pHをpH9.5にゆっくり上昇させ、温度を30℃以下に維持した。温度を55℃にゆっくり上昇させ、そして反応のpHをpHスケール(5NのNaOHで測定)の助けにより9.5に8時間維持した。pHを10.2に上昇させ、そのpHに一夜維持した。溶液を回転蒸発器で除去し、そして最後の少量の水をメタノールを使用して共沸蒸留すると、生成物は黄色粉末(17.9g、異化ナトリウムで汚染されていた)として得られた。¹³C NMRスペクトルは提案した構造と一致していた(多少のモノアルキル化の結果として、少量の欠陥物質のために多少の汚染を伴っていた)。

でPd/Cを除去し、溶液を真空除去し、そしてバイオゲル(Biogel)P2樹脂(25gの水溶液)でゲルろ過した。HClで酸性化すると、オレンジ色の溶液が生成し、これを窒素で一夜バージした。溶液を真空除去すると、生成物が塩酸塩として得られ、これは淡褐色の固体(3.98g、NaClおよびグリコール酸で汚染されており、生成物の最大の理論量は1.15gであった)が得られた。生成物はそれ以上精製しないで使用した。

実施例D D

イイソチオシアナトフェニルメチレンカルボキシレート末端第3ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンの調製

実施例C Cからの生成物(3.98g)を15mlの水中に溶解し、そしてこの溶液のアリコート(2.5ml)を10mlの水で希釈した。この溶液のpHを水酸化ナトリウムで7に調整した。pHスケール(1NのNaOHで測定)を使用してpHを維持し、そして200μlのチオホスゲンを添加した。10分後、この混合物のpHを塩酸で4に調整した。水を回転蒸発器で減圧下に除去した(少量のn-ブタノールを添加して発泡を防止した)。残留物を塩化メチレンで洗浄し、次いで乾燥した。粗生成物(0.95g)すなわちイソチオシアネート(0.14g)と塩酸との混合物はそれ以上精製しないで使用した。

実施例E E

メチレンカルボキシレート末端第2ジェネレーションのスターバーストポリアミドアミンの調製

第2ジェネレーションのスターバーストポリアミドアミン(2.71g、2.6ミリモル)およびプロモ酢酸(4.39g、3.15ミリモル)を3

実施例G G

3.5、4.5、5.5および6.5ジェネレーションのスターバーストPAMAMの調製

2.46gの3ジェネレーションのスターバーストPAMAMの10重量%のメタノール溶液に、2.32gのメチルアクリレートを添加した。この混合物を窒素に84時間放置した。溶液および過剰のメチルアクリレートを除去した後、4.82gの生成物が回収された(理論量の105%)。

より高い1/2ジェネレーションのスターバーストPAMAMの調製:

ジェネレーション4.5、5.5および6.5は、記載するように、反応成分の濃度、反応成分のモル比または反応時間を有意に変化させないで調製した。

実施例H H

4、5および6ジェネレーションのスターバーストPAMAMの調製

2000gの前もって蒸留したエチレンジアミンに、5.4gの4.5ジェネレーションのスターバーストPAMAMをメタノール中の15重量%の溶液として添加した。これを窒素において48時間放置した。メタノールおよび過剰のエチレンジアミンの大部分を回転蒸発器によって水の吸引減圧下に60℃以下の温度で除去した。回収された生成物の合計重量は8.07gであった。ガスクロマトグラフィーは、生成物が、なお、この時点で34重量%のエチレンジアミンを含有することを示した。この生成物の5.94gを100mlのメタノール中に溶解し、そして限外ろ過して残留エチレンジアミンを除去した。ろ過はアミコンTC1Rの薄いチャンネル膜またはパーレーター、アミコンYM2膜を維持する、使用

して実施した。インライン圧力解放弁を使用して、膜を抜切って5.5 psig (380 kPa) の圧力を維持した。溶液をもっぱら膜を通して強制的に流すことによって、100 mlをまず1.5 mlに濃縮した。この最初の濃縮後、流れを体積レチナント (retentate) 再循環モードに18時間交換した。この時間後、80 mlのメタノールを膜の上に流して、このモジュールおよび関連するチューブに存在する生成物を回収した。生成物から溶液をストリッピングし、そして2.35 gの5ジェネレーションのスターバーストPAMAMを回収した。ガスクロマトグラフィーによる分析は、0.3%のエチレンジアミンが生成物中に残留することを示した。

ジェネレーション4および6の調製は、エチレンジアミン対出発物質の重量比をわずかに変更して、上のようになして実施した。第4ジェネレーションを調製するため、この比は200:1であり、そして第6ジェネレーションを調製するため、この比は730:1であった。

実施例1

2-(アセトキシ)安息香酸(アスピリン)のスターバーストデンドリマー中への組み込み

「プローブ分子」がミセルの内部に含まれているかどうかを確認するための広く受け入れられている方法は、非ミセル化媒質中の対ミセル化媒質中のその炭素-13スピン格子緩和時間(T_1)を比較することである。ミセル化媒質中の T_1 の実質的な減少は、ミセル中に「プローブ分子」が含まれていることを示す。スターバーストデンドリマーはミセルの「共有的に固定された」類似体であるので、この T_1 緩和時間の技術を使用して、種々の結晶学的タイプの分子がスターバーストポリアミ

アミンとアソシエーションする度合/程度を確認した。以下の実施例において、(アセトキシ)安息香酸(1) (アスピリン) についての T_1 値は、溶液($CDCl_3$)中で決定し、次いで種々の[1:デンドリマー]のモル比において $CDCl_3$ 中の T_1 値と比較した。

アスピリン(1)を種々のスターバーストポリアミドアミンデンドリマー中にジェネレーションの関数として含めること。

種々の0.5デンドリマー(エステル末端、 NH_2 から開始した)スターバーストポリアミドアミンデンドリマー($G=0.5 \rightarrow 5.5$)を、 $CDCl_3$ 中において2-(アセチルオキシ)安息香酸と一緒にして、酸:第三アミンの比=1.0を得た。2-(アセチルオキシ)安息香酸についての T_1 値対添加したスターバーストデンドリマーのプロット(参照第4図ここで・はC-4を表わし、□はC-8を表わし、○はC-5を表わす)は、 T_1 が2-(アセチルオキシ)安息香酸において炭素4、5および8について2.5→5.5のジェネレーション範囲にわたって最小に到達することを示す。これはデンドリマー($G=2.5 \rightarrow 5.5$)において2-(アセチルオキシ)安息香酸のアソシエーションを立証し、そしてさらにポリアミドアミンデンドリマー($G=2.5$ またはそれより大)が宿主分子として機能することを確証する。

実施例2

スターバーストデンドリマー-PAMAMからのプソイドエフェドリンの解放

プソイドエフェドリン(0.83 mg/ml)およびスターバーストポリアミドアミンデンドリマー「1.0 mg/ml; $G=6.5$; 末端基(Z)-192 (メチルエステル)」を脱イオン蒸留水中に溶解し、そして共

体相のpHを水酸化ナトリウム溶液で9.5に調節し、そして室温において約12時間貯蔵した。プソイドエフェドリン単独の溶液を同一の方法で処理した(対照)。最初の実験後、薬物デンドリマー溶液を40℃で8時間貯蔵し、そして動的透析を実施した。使用した透析膜はスペクトル分離セル(半分のセル体積5および10 ml, セル寸法:両者のセルについて直径3.8 mmおよび、それぞれ、5および10 mlのセルについて1.0および2.0 mmのセル隙)中のスペクトラ/ポル(Por)7、MWC O 1,000 28.6 mm直径であった。

試料をHPLCによって分析し、次のように、プソイドエフェドリンについて展開した:

カラム: ウボンダパク(uBondapak) C-18
移動相: pH 3.2のリン酸緩衝液+アセトニトリル
(80:20)
流速: 0.3 ml/分
検出: UV, 210 nm
保持時間: 13.3分

透析膜を脱イオン水で洗浄し、そして使用前受容体相中で少なくとも12時間ソーキングして保持した。この透析膜を共主体および受容体の区画(compartment)の間に配置し、区画を小さい磁気回転棒で保持した。既知体積の共主体溶液および受容体溶液をそれぞれの区画の中に入れ、そしてプソイドエフェドリンの受容体区画への移送を時間の関数として追跡した。シンク(sink)条件を維持するために、全受容体相を周期的に(30分毎)および新鮮な受容体相と置換した。プソイドエフェドリンの量を試料採取した受容体相においてアッセイした。実験は

室温(22℃)において実施した。受容体相は淡水の(plain)脱イオン蒸留水であった。

動的分析の結果を第5図に示す。第5図において、・はプソイドエフェドリンのみ(対照)を表わし、□はプソイドエフェドリン+デンドリマーを表わし、○は透析前8時間40℃におけるプソイドエフェドリン+デンドリマーを表わす。明らかに、 $G=6.5$ のデンドリマーの存在下に、共主体区画において、プソイドエフェドリンの透析速度は減少する。共主体溶液を40℃で貯蔵すると、透析速度はさらに減少するように思われる。

実験をより低い温度で反復した(薬物分子末端基の数はこの比は同一に保持した)。 $G=6.5$ ジェネレーション、120 μ l/mlのプソイドエフェドリン、100 μ l/mlの(122 μ l/mlの値)。

このより低い温度におけるプソイドエフェドリン(単独)の動的透析は、より高い温度におけるそれにほとんど同一であった。第6図は、この実験の結果を要約し、・はプソイドエフェドリンのみ(対照)を表わし、そして○はプソイドエフェドリン+デンドリマーを表わす。

実施例3

実施例2の手順を反復したが、ただし次の変更を用いた。

受容体相: pH 7.4のリン酸緩衝液

許容体相: pH 7.4のリン酸緩衝液+次の比の薬物およびデンドリマー:

1. $G6.5$: 薬物 : 1 : 192
2. $G5.5$: 薬物 : 1 : 98
3. $G4.5$: 薬物 : 1 : 48

4. G 6.5 H : 炭物 : : 1 : 192

5. G 5.5 H : 炭物 : : 1 : 96

6. G 4.5 H : 炭物 : : 1 : 48

上の共主体相の組成物+ブソイドエフェドリン単独を動的透析にかけた。 dendリマーのジェネレーションの後に文字「H」は、加水分解した dendリマーを意味する。加水分解は実施例MおよびNに記載する手順によって達成した。

これらの実験の結果は第7図に要約してあり、ここで共主体区画および受容体区画はpH 7.5のリン酸緩衝液を含有した。ブソイドエフェドリン単独 (P) について、これらの実験の平均曲線をプロットし (実験で示す)、他の実験からの1つの典型的な試験を示す。第7図において、次の記号は示した dendリマーの dendリマーを表わす。

表 I I I

記号	dendリマーの dendリマー
○	5.5
●	6.5
○	4.5
⊖	5.5 H
○	6.5 H
○	4.5 H

ブソイドエフェドリンは、pH 7.4において dendリマー (加水分解されていない) とアソシエーションしないと思われる。末端の官能基をカルボキシレート形態に加水分解すると、透析速度に顕著な結果が起る (減少)。ジェネレーションの数は透析速度に影響を及ぼさない

(ジェネレーション=4.0) を含有し、HCl 濃度で pH 6.5 および 5.0 の調節した溶液の 1.0 ml を、透析セルの共主体区画に入れ、そして等体積の精製したウェルを同一 pH に調節して受容体区画に入れた。受容体区画中のサリチル酸の移送を監視した。結果を第8図に記載する。第8図において、遊離酸は●で表わされ、酸+ジェネレーション 4.0 の dendリマー、pH 6.5、は○によって表わされ、そして酸+ジェネレーション 4.0 の dendリマー、pH 5.0、は□で表わされている。

pH 6 におけるポリマー上のアミン基のイオン化率は低いため、サリチル酸とのより大きい相互作用の程度が pH 5 において期待することができ、より低い pH において移送される化合物はより少ないであろう。第8図に記載する結果が示すように、サリチル酸の対照の研究に比較して、両者の pH におけるポリマーの存在下に移送されるサリチル酸の百分率は非常に低い。また、より多くにサリチル酸は、予測されるように、pH 5.0 におけるよりも pH 6.5 において移送されることが観察される。データは、スターバーストポリマーとサリチル酸との相互作用は pH によってコントロールできることを立証している。ポリマーの存在下のサリチル酸のレベルは対照研究において観察されたほぼ 12 時間の平衡点を過ぎて上昇しつづけるので、持続した放出の特徴が、また、このデータによって説明される。

サリチル酸とスターバーストポリマー (G=4.0) との相互作用の特徴をさらに研究するために、実験を pH 8.8 において計画した。この研究の計画は、サリチル酸溶液 (1 mg/ml)、pH 8.0 に調節した、のみを共主体区画に入れ、そしてポリマー溶液 (2.5 mg/ml) を受容体

ように思われる。

実施例 4

サリチル酸と PAMAM スターバースト dendリマーとの相互作用の研究

この実施例は、サリチル酸と PAMAM スターバースト dendリマーとの相互作用の特徴を評価した。これらの dendリマーはアンモニア開始コアと N-(2-アミノエチル) アクリルアミドから誘導された反復単位から成っていた。完全 (full) (アミン末端官能) ジェネレーションのポリマーおよび半分 (エステル末端官能) ジェネレーションポリマーの両者を、この研究に含めた。この実験において使用したサリチル酸対スターバースト dendリマーの比は、完全ジェネレーションのポリマーについてほぼ 1 サリチル酸分子対 1 末端アミン官能基を生じた。半分ジェネレーションのポリマーの研究において、より高い分子量のポリマーについて変更を行なって同一の比を用いた。

実験は室温において平衡の静止セル透析方法に従って実施した。スペクトラポル (Spectra Por) 6 膜 (分子量のカットオフ=1000) によって分離したスペクトル静止透析セル (半分のセルの体積、1.0 ml) を、すべての実験において使用した。サリチル酸の移送は、適当なセル区画からのアリコートを取り出すことによって時間の関数として監視し、そして HPLC 分析により、298 nm において UV 検出器を使用してアッセイした [ボンズバグ (Bondapak) C-18 カラム、アセトニトリル/0.1 モルのリン酸緩衝液 (pH 3.2) の移動相を 20:80 (v/v) の比で希釈し、3.0 ml/時間の流速に設定した]。

1 mg/ml のサリチル酸および 2.5 mg/ml のスターバーストポリマー

区画に入れたことにおいて、前の実験と異なった。共主体区画からのサリチル酸の損失を、前述のように監視した。この実験の結果を第9図に記載する。第9図において、遊離酸は●で表わされ、そして酸+ジェネレーション 4.0 の dendリマー、pH 8.0、は—△—で表わされている。

第9図に示すように、受容体区画中のサリチル酸と受容体区画中のスターバーストポリマーとの平衡の特徴はサリチル酸の対照の研究と異なる。pH 8 における分子のイオン化特性に基づいて、ほぼ 6~7% の相互作用が期待される。観察された相互作用の程度は 4~5% 程度であることが示される。観察されるより低いアソシエーションは、実験の変動性のため、あるいはより低いイオン定数のためであろう。

この実験は、この系の遠位相からのポリマーによる遊離サリチル酸の吸収または除去を示す。このタイプの作用は、分子の反応性の抑制を生ずることがあり、ポリマーに関連するキレート化のタイプの性質の可能性を示唆している。

エステル末端官能基を有する半分のジェネレーションのスターバーストポリマー (G=4.5) との pH 6.5 におけるサリチル酸の相互作用の特徴を評価した。サリチル酸 (1 mg/ml) をスターバーストポリマー (G=4.5) 3.6 mg/ml と pH 6.5 において一層にした。1.0 ml のこの溶液を共主体区画に入れ、そして共主体区画からの移送を前述のように監視した。結果を第10図に記載する。第10図において、遊離酸は●で表わされ、そして酸+ポリマーは—○—で表わされている。

これらの実験の条件下に、第三アミン基は pH 8.5 においてイオン

化しないので、電荷の相互作用が起こることは予測されない。第10図に示すように、ポリマー (G=4.5) の存在下のサリチル酸の損失は、遠析の最初の10時間の間、サリチル酸の対照の研究のそれと事実上同一である。

この実施例において提供されたデータから、次の観察がなされる:

- (1) 完全ジェネレーションのPAMAMスターバーストポリマーは、サリチル酸の宿主として機能する。
- (2) 完全ジェネレーションのPAMAMスターバーストポリマーは、サリチル酸について持続した解放官能性を有する。
- (3) 完全ジェネレーションのPAMAMスターバーストポリマーのサリチル酸組特性質は、pHによってコントロール可能である。

実施例5

ナトリウムプロピオネート末端第6ジェネレーションのスターバーストポリアミドアミンによる鉄の多量キレート化の立証

ナトリウムプロピオネート末端第6ジェネレーションポリアミドアミン (アンモニウムから開始した) (97.1 mg, 2.45 mol) を、1.5 ml の脱イオン水中に溶解した。0.5 ml の0.5 NのHClを添加し、pHを6.3に減少した。塩化第二鉄を (0.5 ml の0.1.2 molの溶液、0.051ミリモル) を添加すると、淡褐色のゼラチン状沈殿を生成した。60℃に0.5時間加熱すると、ゼラチン状沈殿は可溶性となり、均質なオレンジ色の溶液が形成した。この溶液をバイオゲル (Biogel) P2アクリルアミドゲル (10g, 2回) でろ過し、オレンジ色帯を分離した (ハロゲン化合物を含有しない)。溶媒を真空除去すると、生成物は

中で風乾し、そして70℃に4時間加熱した。深紅色に変わり、そしてロジウム的大部分は吸収された。未反応のロジウムをろ過によって除去し、そして溶媒を回転蒸発器で除去した。形成した物はクロロホルムに可溶性であった。これをウェルで洗浄し、乾燥 (MgSO₄) した後、溶媒を除去すると、赤色油 (0.18g) が得られた。NMRスペクトルをCDCl₃中で記録し、キレート化スターバーストと非キレート化スターバーストとの間にはほんのわずかの差が認められた。このCDCl₃の一部をエタノールで希釈し、次いでNaBH₄を添加すると、ロジウムの沈殿が生じた。RhCl₃・3H₂Oはクロロホルム中およびクロロホルムのスターバースト溶液中に不溶性であり、こうしてキレート化が確認される。

実施例7

スターバーストポリマーに対してキレート化したPdを含有する生成物の調製

3.5ジェネレーションのPAMAM (エステル末端、NH₂から開始した) (1.1g, 0.24ミリモル) を、攪拌しながらアセトニトリル (50 ml) 中に溶解した。塩化パラジウム (0.24g, 1.4ミリモル) を添加し、そしてこの溶液を70~75℃ (水浴) に一夜加熱した。PdCl₂はスターバースト中に吸収された。溶媒を除去した後、CDCl₃中のNMRは、キレート化が起こったことを確認した。CDCl₃溶液をエタノールで希釈し、そしてNaBH₄を添加すると、パラジウムが沈殿した。キレート化生成物 (1.23g) は褐色油として分離された。

実施例8

酢酸イットリウムからのトランスキレート化 (trans chelation)

オレンジ色フィルム (30 mg) として得られた。分析はスターバースト dendrimer の1モルにつきほぼ20モルの第二鉄イオンのキレート化と一致した。

表 IV

実測値	理論値		
	Na ₂ Fe ₂₀ H ₁₂₀ SB	Na ₂ Fe ₂₀ H ₁₂₀ SB	Na ₂ Fe ₂₀ H ₁₂₀ SB
Na 0.39, 0.24 (0.31 0.1%)	0.25	0.31	0.38
Fe 3.14, 3.11 (3.12 0.02%)	3.05	3.05	3.04
C 47.11	49.87	49.84	49.81
H 7.33	7.31	7.30	7.29
N 14.81	14.49	14.48	14.17
O ---	25.03	25.02	25.01
分子量	36632.23	36654.21	36375.18
SB=C ₁₂₀ H ₁₂₀ N ₂₀ O ₂₀			

これらの結果は、スターバースト dendrimer の1モル当り20±2モルの第二鉄イオンのキレート化を確認する。

実施例6

スターバーストポリマー当り1ロジウム原子より多くを含有する生成物の調製

2.5ジェネレーションのPAMAM (エステル末端、NH₂から開始した) (0.18g, 0.087ミリモル) およびRhCl₃・3H₂O (0.09g, 0.3ミリモル) をジメチルホルムアミド (DMF) (15 ml)

によるメチレンカルボキシレート末端第2ジェネレーションのスターバーストポリエチレンジアミンによる、イットリウムの多量キレート化の立証

スターバーストポリエチレンジアミンメチレンカルボキシレート末端物質 (0.46g, 52.5%活性、異部臭化ナトリウム、0.18ミリモルの活性スターバースト dendrimer)、実施例PFから、を4.5 mlの酸化ジウテリウム中に溶解した。生じたpHは1.5~1.2であった。酢酸イットリウムの溶液は、塩化イットリウム (0.15g, 0.5ミリモル) および酢酸ナトリウム (0.41g, 0.5ミリモル) を1.5 mlの酸化ジウテリウム中に溶解することによって調製した (dendrimer の1モルにつき2.9モルのイットリウム)。酢酸イットリウムの0.5 mlのアリコート dendrimer 溶液に添加し、そして¹³C NMRスペクトルを75.5 MHzにおいて記録した。

酢酸イットリウムの¹³C NMRスペクトルは、2つの共鳴、カルボキシル炭素について184.7 ppmおよびメチル炭素について23.7 ppmを示し、これに比較して酢酸ナトリウムについて182.1および24.1 ppmおよび酢酸について177.7および20.7 ppmを示す [サトラー (Sadtler) ¹³C NMR標準スペクトル]。これらのバンドの位置を監視すると、スターバースト dendrimer とのキレート化の程度が示される。キレート化を指示するスターバースト dendrimer についての最も有益なシグナルはα-C-H₂ (キレート化に酸化するメチレンカルボキシレート基) であり、これはキレート化しない dendrimer において58.4 ppmに現われ、そしてキレート化した dendrimer において63.8に現われる。イットリウムとキレート化すると、時間α-C-H₂

のスピニング速度と時間は、期待するように、 0.24 ± 0.01 秒から 0.14 ± 0.01 秒に短縮し、キレート化を指示する。

0.5mlの酢酸イットリウム溶液をスターバーストデンドリマーに添加した後、すべてのイットリウムはデンドリマーによってキレート化されるように思われ、酢酸ナトリウムのそれである酢酸イットリウムのシグナルによって確認される。同一の試料は、酢酸イットリウム溶液の第2の0.5mlのアリコートに添加によって認められた。酢酸イットリウムの第3のアリコートを添加すると、イットリウムのすべてはスターバーストのキレートとして吸収されることが観察され、アセテートカルボキシル共場が 183.8 ppmにシフトすることが観察され、イットリウムの一部が酢酸塩とアソシエーションすることが示された。デンドリマー上のキレート化-C-H基の積分した面積は増加し、添加したイットリウムの第3モル当量の一部が事実上デンドリマーとキレート化したことが示された。この結果が示すように、デンドリマーはデンドリマー分子の1つにつき2〜3個のイットリウムイオンとキレート化することができ

実施例9

酢酸イットリウムからのトランスキレート化 (trans chelation) によるメチレンカルボキシレート末端第2ジェネレーションのスターバーストポリアミドアミンによる、イットリウムの多量キレート化の立証
実施例8において使用したのと同一の実験方法を、この研究に使用した。スターバーストポリアミドアミンメチレンカルボキシレート末端物質(0.40g, 82.5%活性、純粋なナトリウム、0.12ミリモル)を、4〜5mlの酸化ジユウテリウム中に溶解した。生ずるpH11.5-

12であり、これを実験前に6NのHClで9.4に低下させた。酢酸イットリウムの溶液は、塩化イットリウム(0.1125g, 0.37ミリモル)および酢酸ナトリウム(0.0915g, 1.1ミリモル)を1.5mlの酸化ジユウテリウム中に溶解することによって調製し、こうして各0.5mlの溶液は1モル当量の金属を含有した。

最初の2モル当量の添加した酢酸イットリウムを、スターバーストポリアミドアミンで完全にキレート化した。第3モル当量のイットリウムを添加したとき、生成物が沈殿し、そしてそれまではNMRのデータを得ることができなかった。スターバーストデンドリマーによるキレート化について最良の有益な情報を与えるシグナルは、キレート化する要素に隣接する2つの炭素のものであった。キレート化しないデンドリマーにおけるこれらの炭素の化学的シフトは、 α -CH₂について59.1 ppm、および主鎖の最初のメチレン炭素について53.7 ppmにおいて起こった。キレート化すると、これらの2つの共場は、それぞれ、60.8および55.1 ppmにダウンフィールドにシフトすることが観察された。トランスキレート化は、デンドリマー分子につき2つの金属イオンが容易にキレート化されうことを示すが、第3モル当量のある未知の分画がキレート化すると、生成物は溶液から沈殿する。

実施例10

メチレンカルボキシレート末端第2ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンによる⁹⁰Yの多量キレート化の立証
塩化イットリウムの標準の溶液(3×10⁻³モル、塩体を添加しない⁹⁰Yを加えた)およびメチレンカルボキシレート末端第2ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンの標準の溶液(6×10⁻³モル)

表 V

2.5 ジェネレーションのPEIアセテートと⁹⁰Yとのキレート化

体積Y+3	体積PEI	体積BEPES	M:L理論	X試料	M:L酢酸塩
5	30	370	0.1	110	0.1
10	30	360	0.2	101	0.2
20	30	350	0.4	95	0.4
30	35	340	0.5	97	0.5
30	30	340	0.5	102	0.5
60	30	310	1.0	99	1.0
120	30	250	2.0	100	2.0
180	30	180	3.0	94	2.8
250	30	120	4.1	80	3.3
300	20	80	7.5	44	3.3
300	20	70	5.0	40	2.0
300	20	70	5.0	41	2.0

表Vにおける体積はマイクロリットルの単位である。

実験の精度の範囲内で、これらの結果が示すように、2.5 ジェネレーションのスターバーストPEIアセテートはポリマー当り2〜3金属をキレート化して可溶性の錯体を形成する。

実施例11

4-イソチオシアナトフェニルメチレンカルボキシレート末端第3ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンと1gモノクロール試料とのコンジュゲーション

を調製した。これらをHEPES緩衝液中で様々な金属：スターバースト比で一斉に反応させた。錯体の収率は、イオン交換クロマトグラフィーにより、セファデックス(Sephadex) G50イオン交換ビーズを使用し、10%のNaCl: NH₄OH、4:1、pH10、で溶離することによって決定した。錯化しない金属はこのカラム上に除去され、錯化した金属は溶離する。収率は、ウェルカウンター(well counter)を使用して、分離された放射能をカラム上のそれと比較することによって得た。

イソチオシアネート、10mg (50 μ l)、実施例DDから、を、放射性塩化インジウム-111を加えてある、3ミリモルの塩化インジウムの500 μ l中に溶解し、そしてpHを660 μ lの1NのNaOHで9に調整した。次いで、金抗体1gG C C-48のアリコートにキレート化したスターバーストのアリコートと混合した。次いで、この混合物を18時間照渡したまま放置した。次いで、この混合物をHPLC [カラム、デュボン、ゾルバクス・バイオスフェア (Zorbax Biosphere) GF-250; 溶媒系、0.025モルの酢酸ナトリウム、pH6] および254nmにおいてUV検出器および放射能検出器によって分析した。結果を表V-1に示す。

表 V I

スターバースト-1.4Gコンジュゲート

	1	2	3	4
1gG 添加 (μl)	20	20	20	20
キレート化スター バースト溶液 (μl)	5	20	50	100
1gG 上の放射能 %	6	5	5	3
コンジュゲシ ンした 1gG %	2	7	17	22

实施例 12

4-イソチオシアナトフェニルメチレンカルボキシレート末端第3ジ
エネレーションのスターバーストポリエチレンイミッドと1,6Gモノク

ローナル抗体とのコンジュゲーション

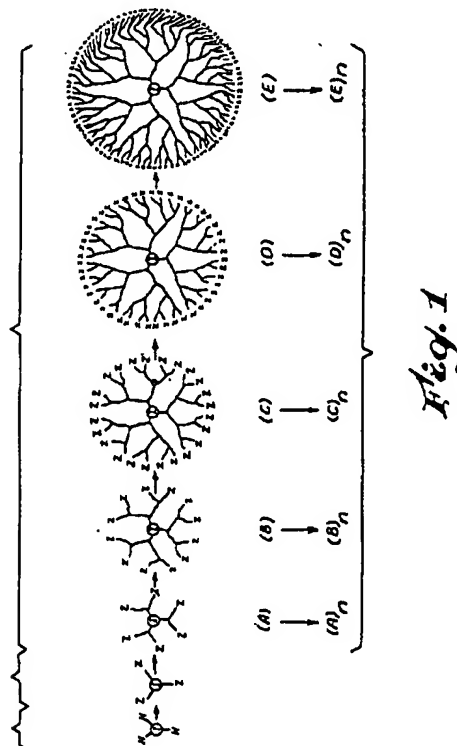
実施例D4からのイソチオシアネート、4 μ g (20 μ モル)を200 μ lの3ミリモルの塩化インジウム (80 μ モル)と混合した。次いで、この溶液の20 μ lのアリコートに放射性塩化インジウム-111を加え、そしてpHを3.0 μ lのNaOHおよび1.0 μ lの0.1 M HClの添加によって9に調整した。このインジウムキレート、150 μ lのCC-49金抗体1 μ g、10 μ g/mlと、50ミリモルのHEPES緩衝液中でpH 9.5において混合した。室温において18時間後、抗体を調整用HPLC [カラム、デュポン、ゾルバックス・バイオスフェア (Zorbax Biosphere) GF-250; 移動剤、0.025モルの酢酸ナトリウム、pH 8]; および254 nmにおけるUV検出器および放射能検出器によって回収した。回収した抗体をアミコン膜上で濃縮し、そしてPBS緩衝液中にpH 7.4において交換した。回収された抗体はほぼ0.5 μ ci/100 μ gの比活性を有した。

实施例 13

¹²¹I 標識スターバースト抗体コンジュゲートの生体内局在化

実施例 2 において調製した腫瘍スーパースト抗体コンジュゲートの有用性は、無胸腺症のマウスにおけるヒト腫瘍異種移植片による、この物質の吸収を測定することによって立証された。ノスの無胸腺症のマウスに、ヒト結腸癌細胞系、LS-174T (ほぼ 4×10^5 細胞/動物) を皮下的に接種した。接種後ほぼ 2 週に、各動物の尾の静脈を腫瘍に注射した。マウスは 17 および 48 時間後に殺し (各時点において 5 匹の動物)、腫瘍および選択した組織を切除し、秤量し、そして放射能をガンマ線カウンターで測定した。17 時間後、組織 1g につき注射した

投与量の13.5%が腫瘍に局在化していた。48時間後、組織1gにつき注射した投与量の21.6%が腫瘍に局在化していた。



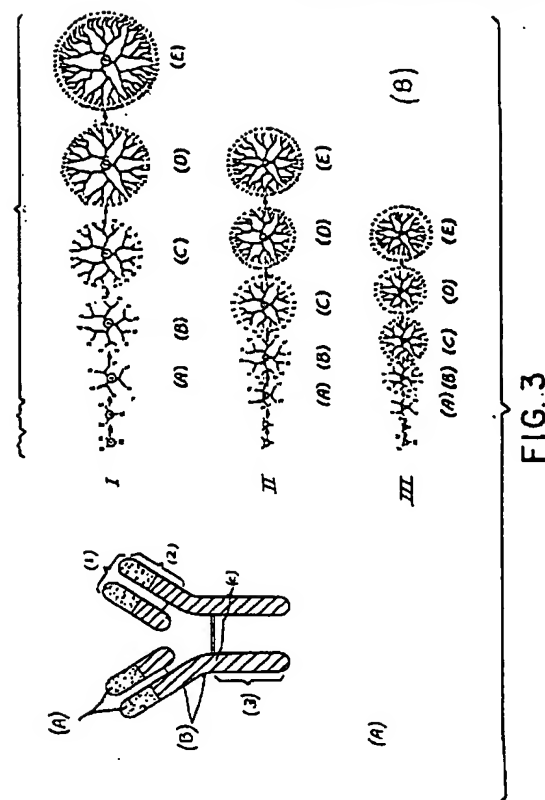
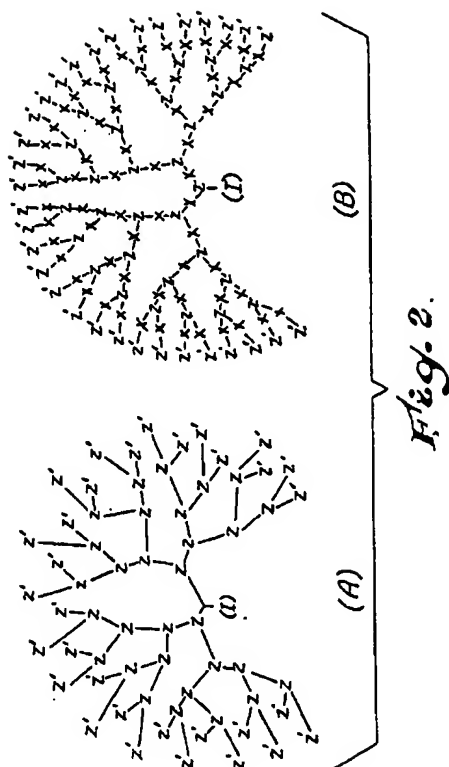


FIG. 4

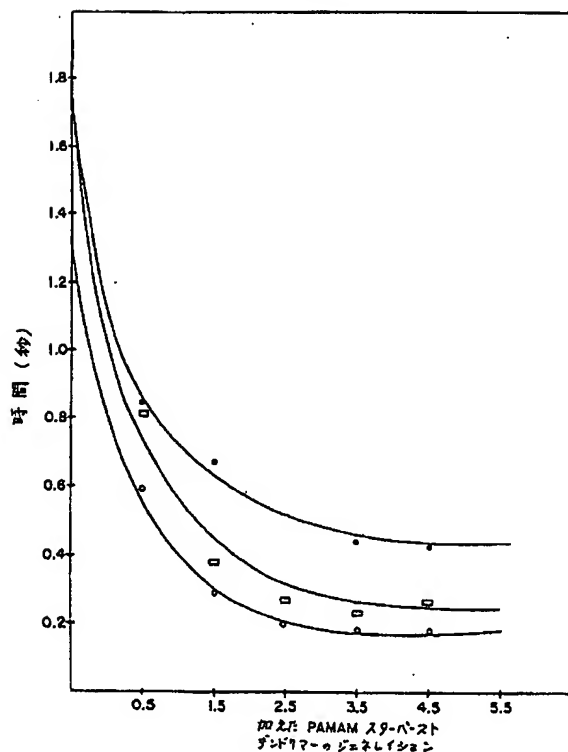


FIG. 5

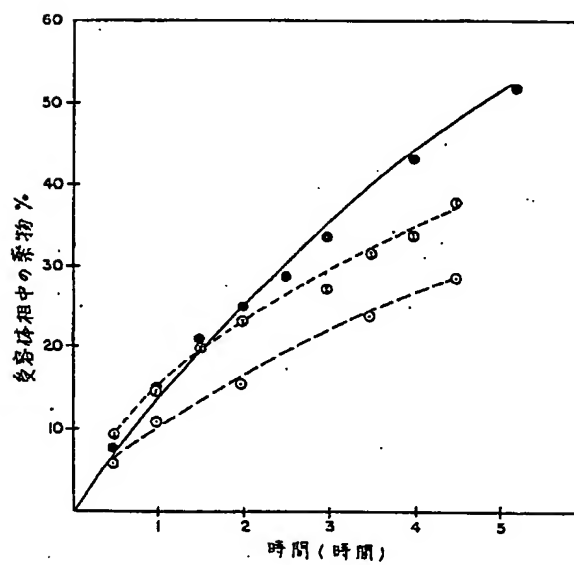


FIG. 6

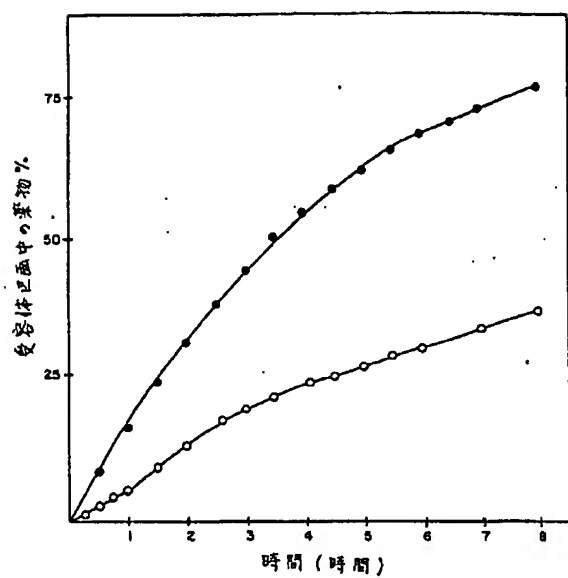


FIG. 7

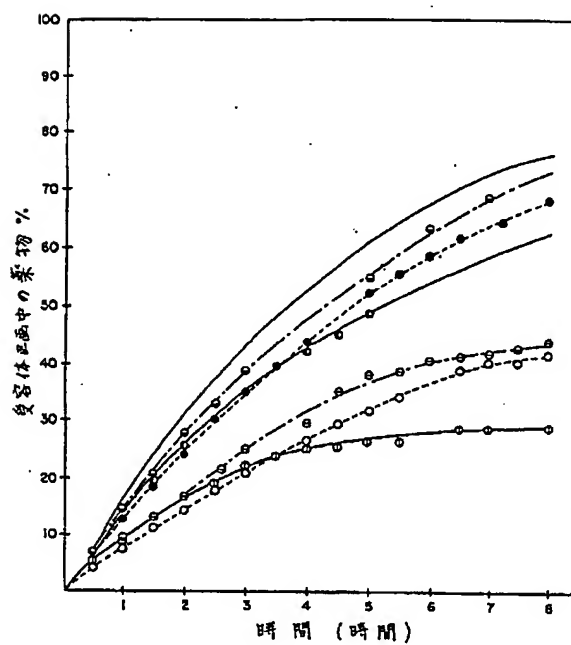


FIG. 8

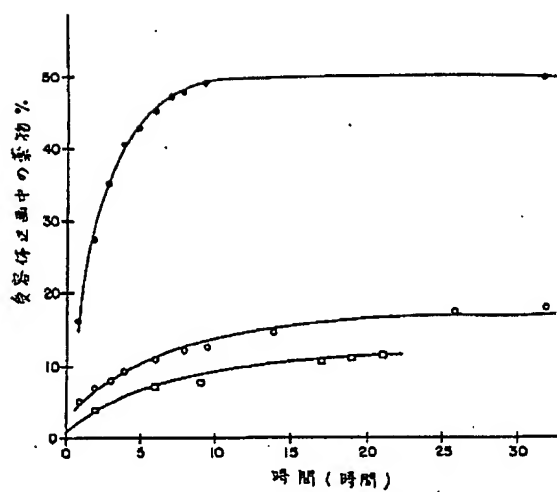


FIG. 9

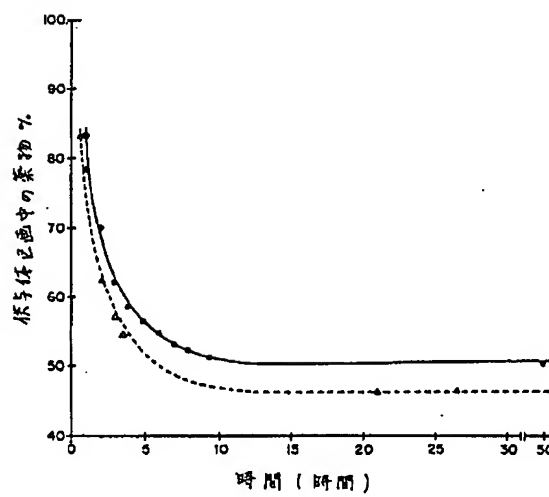
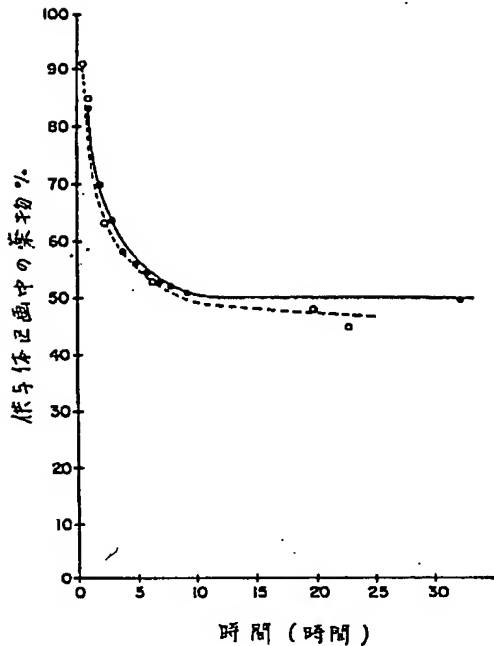


FIG. 10



特表昭63-501876 (27)

補正書の写し (翻訳文) 提出書 (特許法第184条の7第1項)

昭和63年4月18日

特許庁長官 小川 邦 夫 殿

1. 特許出願の表示

PCT/US87/02074

2. 発明の名称

スターバーストコンジュゲート

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・アポットロード・ダウセンター2030

名称 ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー

4. 代理人 〒107

住所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

日本自動車会館

氏名 (6078) 弁理士 小田 島 平 吉

電話 585-2256

5. 補正書の提出年月日

1988年1月8日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し (翻訳文)

1通

特 許 庁

補正請求の範囲

1、少なくとも1種の単位、少なくとも1種の保持された製薬学的物質とアソシエーションして少なくとも1種のスターバーストポリマーを含むでなるスターバーストコンジュゲート。

2、前記スターバーストポリマーはスターバーストデンドリマーである請求の範囲第1項記載のコンジュゲート。

3、前記少なくとも1種の保持された製薬学的物質は、薬物、放射性核種、キレート剤、キレート化金属、トキシン、抗体、抗体断片、抗原、シグナル発生因子、シグナル反射因子、またはシグナル受取因子である請求の範囲第1または2項記載のコンジュゲート。

4、少なくとも2種の異なる保持された物質が存在し、それらの少なくとも1種は標的ディレクターであり、そしてそれらの少なくとも1種は生物活性因子である請求の範囲第2項記載のコンジュゲート。

5、前記標的ディレクターは1種または2種以上の標的レセプターに対して特異的である実在因子であり、そして前記生物活性因子は放射性核種、薬物、またはトキシンである請求の範囲第4項記載のコンジュゲート。

23、前記除去部分は、キレート剤、抗体または抗体である請求の範囲第22項記載の方法。

24、式

$$\{(T)_{a-(C')^f}g*(P)_x*[(C'')_b-(M)_y]h$$

(III)

式中、

各C' は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

各C'' は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

aおよびbの各々は個々に1またはそれより大きい整数を表わし、

fおよびhの各々は個々に0またはそれより大きい整数を表わし、

-は結合基が存在する場合共有結合を示し、

各Pはデンドリマーを表わし、

xは1またはそれより大きい整数を表わし、

Tは標的ディレクターを表わし、

各Mは保持された製薬学的物質の単位 (例えば、分子、原子、イオンおよび/または他の基本単位) を表わし、前記保持された製薬学的物質は同一の保持された製薬学的物質または異なる保持された物質であることができ、好ましくは前記保持された製薬学的物質は生物活性因子であり、

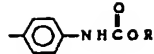
yは1またはそれより大きい整数を表わし、そして

*は前記保持された製薬学的物質が前記デンドリマーとアソシエーションしていることを示す、

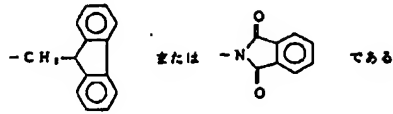
のスターバーストコンジュゲートを調製する方法であって、反応性部分を有するPを、保護されたNH₂基をもつことができる、結合基、例えば、アニリン部分と反応させることを含んでなる前記方法。

25、反応性部分を有するPを、保護されたNH₂基をもつことができる、結合基、例えば、アニリン部分と反応させることを含んでなる請求の範囲第1項記載のスターバーストコンジュゲートを調製する方法。

26、前記保護基は、式

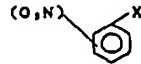


式中Rは $-C(CH_3)_3$ 、 $-CH_2-$ 、



を有する請求の範囲第25項記載の方法。

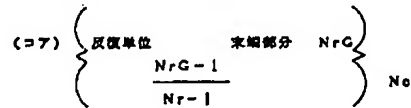
27. Rは、また、式



式中、nは1または2であり、そしてXはF、Cl、Br、I、 SO_2 、Clであり、そしてnが1であるとき、 NO_2 基はパラ位置に存在する、の取り付けた結合基（ハンドル）を有する請求の範囲第25項記載の方法。

28. 前記結合基は4-フルオロニトロベンゼンである請求の範囲第27項記載の方法。

29. 前記スターバーストコンジュゲートは、式



①

に結合した官能基を表わし、そしてNcはコアの原子価を表わし、反復単位は式 $X^i Y^i (Z^i) N^i$ によって表わされ、ここで「i」は上に定義した通りであり、最後のすなわち末端の単位は式 $X^i Y^i (Z^i) N^i$ によって表わされ、ここでiは末端のジェネレーションを表わし、そして X^i 、 Y^i 、 Z^i および N^i は X^1 、 Y^1 、 Z^1 および N^1 と同一であるかあるいは異なることができ、ただしZ基に結合した連続するジェネレーションは存在せず、そしてNは2より小さいことができ、n官能性はその定義した限界の間のすべての値の範囲、例えば、

$$\prod_{n=1}^{i-1} Na = (N^1)(N^2)(N^3) \dots (N^{i-1})(N^i)$$

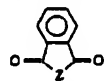
であり、これは反復単位、 $X^i Y^i (Z^i) N^i$ の数であり、前記反復単位は1つの樹枝状の枝のそのジェネレーションを含み、そしてiが1であるとき、 $n^0=1$

$$n=1$$

である、

を有する請求の範囲第2項記載のコンジュゲート。

31. 反応性部分を有するPを、式



のN-フタルイミドによって保護された NH_2 基をもつことができる、

式中、コアは末端基の#ノ樹枝状の枝-

$$\frac{Nr^G}{2}$$

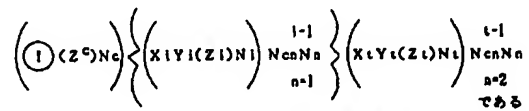
であり、Gはジェネレーションの数であり、Nrは少なくとも2である反復単位の多重度であり、Ncはコア化合物の原子価であり、末端部分は次式によって決定される：

$$\frac{NcNr^G}{2}$$

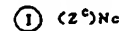
式中、Nr、GおよびNcは上に定義した通りであり、そして反復単位は $Nr+1$ の原子価または官能価を有し、ここでNrは上に定義した通りである、

を有する請求の範囲第2項記載のコンジュゲート。

30. 前記スターバーストコンジュゲートは、式



式中iは「i-1」であり、そしてコアの化合物は式



で表わされ、ここで



はコアを表わし、 Z^G は

アニリン部分と反応させることを含んでなる請求の範囲第1項記載のスターバーストコンジュゲートを調製する方法。

32. 反応性部分を有するPを、スターバーストの合成に使用する条件下で不活性であるアミンについて使用する保護基によって保護された NH_2 基をもつことができる、アニリン部分と反応させることを含んでなる請求の範囲第1項記載のスターバーストコンジュゲートを調製する方法。

33. スターバーストポリエチレンイミン/タンソルホンアミドを塩酸と反応させることを含んでなるスターバーストポリエチレンイミンを調製する方法。

34. 膜を使用する限外ろ過によって前線を除去することを含んでなる存在する前線を有するスターバーストデンドリマーを調製する方法。

35. 前記前線はエチレンジアミンである請求の範囲第34項記載の方法。

36. ランタニドをスターバーストポリエチレンイミンアセテートとキレート化することを含んでなる、前記スターバーストポリマーがスターバーストデンドリマーであり、そして前記担持された物質がランタニドである請求の範囲第1項記載のスターバーストコンジュゲートを調製する方法。

国際調査報告

International Application No. PCT/US 87/02074

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor's classification, IPC Class, etc.)	
INT. CL. 461K 49/02 US. CL. 824/1.1	
2. FIELD OF SEARCH	
Classification Scheme: U.S. 430/1.1, 9 525/410, 416, 418, 451 528/310, 332, 350, 363, 397	
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Relevant to Claim No. 14
A	US. A. 4,558,120 PUBLISHED 10 DECEMBER 1985 TONALIA ET AL 1-27
P, A	US. A. 4,606,907 PUBLISHED 19 AUGUST 1985 JIMON ET AL 1-27
T	US. A. 4,694,064 PUBLISHED 15 SEPTEMBER 1987 TONALIA ET AL 1-27
4. STATEMENT OF INVENTION	
Date of the Actual Completion of the Invention: 29 OCTOBER 1987 Date of Filing of the International Search Report: 24 NOV 1987 International Searching Authority: ISA/US Signature of Searching Officer: John Healey	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (May 1986)

International Application No. PCT/US 87/02074

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
5. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) for the following reasons: <input type="checkbox"/> Claim numbers ... because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: <input type="checkbox"/> Claim number ... because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to enable the Authority to conduct a meaningful international search can be carried out in accordance with Article 17(2).	
6. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International Application as follows: I. Claims 1-21 drawn to a stirrurast conjugate and process of preparing classified in class 424 subclass 1.1. II. Claims 22-27 drawn to a process of preparing a stirrurast conjugate classified in class 524 subclass 353. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, the International Search Report covers all searchable claims of the International Application. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims of the International Application for which fees were paid, specifically claims: <input type="checkbox"/> The required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is established in the language first mentioned in the claims: it is reported by this Authority: <input type="checkbox"/> As an applicant's claims could be amended without effect (pending an amendment fee), the International Searching Authority did not amend the claims at any additional fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

Form PCT/ISA/210 (International Search Report) (May 1986)

第1頁の続き

⑦発明者 チェン, ロバート・シー

⑧発明者 トムリンソン, イアン・エイ

⑨発明者 ファジオ, マイケル・ジェイ

⑩発明者 ヘッドストランド, デビッド・エム

アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・オールドバイントレイル3873

アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・バーチフィールドドライブ3316

アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・フォレストビュードライブ4617

アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・ウェストチツペワリバーロード506

12

EUROPEAN PATENT APPLICATION

21 Application number: **87307266.4**

51 Int. Cl.: **A61K 47/00 , A01N 25/10**

22 Date of filing: **17.08.87**

30 Priority: **18.08.86 US 897455**

43 Date of publication of application:
15.06.88 Bulletin 88/24

84 Designated Contracting States:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Applicant: **THE DOW CHEMICAL COMPANY**
2030 Dow Center Abbott Road P.O. Box 1967
Midland, MI 48640(US)

72 Inventor: **Tomalia, Donald A.**
463 West Chippewa River Road
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: **Kaplan, Donald A.**
919 East Park Drive
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: **Kruper, William J.**
230 Barden Road
Sanford Michigan 48657(US)
Inventor: **Cheng, Roberta C.**
3873 Old Pine Trail
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: **Tomlinson, Ian A.**
3316 Birchfield Drive
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: **Fazio, Michael J.**
4617 Forestview Drive
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: **Wilson, Larry R.**
550 Eight Mile Road
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: **Hedstrand, David M.**
506 West Chippewa River Road
Midland Michigan 48640(US)

74 Representative: **Burford, Anthony Frederick et**
al
W.H. Beck, Greener & Co. 7 Stone Buildings
Lincoln's Inn
London WC2A 3SZ(GB)

EP 0 271 180 A1

54 **Starburst conjugates.**

57 **Starburst conjugates which are composed of at least one dendrimer in association with at least one unit of a carried agricultural, pharmaceutical, or other material have been prepared. These conjugates have particularly advantageous properties due to the unique characteristics of the dendrimer.**